

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

**Messung des Abbaus von DFP
im menschlichen Serum
mittels Gaschromatographie**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Eva Pelikan
aus Eilenburg

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen - Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Messung des Abbaus von DFP im menschlichen Serum mittels Gaschromatographie

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Eva Pelikan
aus Eilenburg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr.Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.1983

GLIEDERUNG

I Einleitung

II Physikalische und chemische Eigenschaften des DFP

1. Physikalische Eigenschaften
2. Chemische Eigenschaften
 - a) Spontane Hydrolyse
 - b) Enzymatische Hydrolyse
 - c) Bindung an ein Protein
 - d) Katalysatoren der Hydrolyse des DIP-Enzym-Komplexes

III Pharmakologische Eigenschaften des DFP

1. DFP als Cholinesterasehemmer
 - a) Hemmung von Pseudo- und Aliesterasen
 - b) Die Hemmung der Cholinesterase im Gehirn
2. Eigenwirkung des DFP - unabhängig von der Cholinesterasehemmung
3. Klinische Zeichen einer Intoxikation mit DFP
4. Therapie von Intoxikationen mit DFP
5. Einsatz von DFP als Medikament

IV Kinetik von DFP im Organismus von Säugetieren

1. Verteilung im Blut
2. Verteilung im Gewebe
3. Ausscheidung

V DFPase

1. Wirkungsweise der DFPase
2. Substratspezifität der DFPase
3. Einfluß des pH-Wertes auf die enzymatische Hydrolyse von DFP
4. Aktivatoren und Inhibitoren der Hydrolyse von DFP
5. Vorkommen der DFPase

VI Problemstellung

VII Eigene Untersuchungen

1. Gaschromatographische Bestimmung des DFP

- a) Prinzip
- b) Geräte und Ausrüstung
- c) Verwendete Chemikalien und Lösungen
- d) Arbeitsvorschrift
- e) Berechnung
- f) Präzision
- g) Ermittlung der zur Extraktion geeigneten Natriumsulfatmenge
- h) Eichkurve
- i) Wiederfindung

2. Untersuchungsergebnisse:

Vergleich des DFP-Verlustes in Ansätzen mit Serum und mit Puffer

- a) Gegenüberstellung des DFP-Verlustes innerhalb von 10 sec. bei niedrigen Konzentrationen von DFP in Ansätzen mit Serum und mit Puffer
- b) Zeitlicher Verlauf der DFP-Abnahme in Ansätzen mit Serum und mit Puffer
 - (1) Ansätze von DFP in Serum
 - (2) Ansätze von DFP in Serum und in Puffer
- c) Verlauf der DFP-Abnahme in vorher erhitztem Serum
 - (1) DFP-Abnahme in vorher erhitztem, unverdünnten Serum
 - (2) DFP-Abnahme in bereits mit Puffer verdünntem, vorher erhitztem Serum
- d) Aufstockung

3. Auswertung: Diskussion des Abbauverhaltens von DFP

- a) Abnahme von DFP in Phosphatpuffer
- b) Abnahme von DFP im erhitzten und nichterhitzten Serum
 - (1) Abnahme von DFP im Serum bei einer Temperatur von 25° C
 - (2) Abnahme von DFP in vorher erhitztem Serum
 - (11) Vorherige Erhitzung des Serums 30 Min. bei 55°C
 - (22) Vorherige Erhitzung des Serums 60 Min. bei 55°C
 - (33) Vergleich der Abbaugeschwindigkeit von DFP in erhitztem und nichterhitztem Serum
- c) Gleichgewicht der Reaktion
- d) Proteinbindung und enzymatischer Abbau von DFP im Serum
 - (1) DFP-Abnahme im Serum: eine Reaktion 1. Ordnung?
 - (2) Vergleich des Abbaus steigender Mengen von DFP im Serum im ersten Zeitintervall
 - (3) Vergleich der Kurvenverläufe der DFP-Abnahme im Serum bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen
- e) Vergleich der Halbwertszeiten von DFP im Serum bei verschiedenen Konzentrationen
- f) Gegenüberstellung der DFP-Abnahme in Serum bzw. in Puffer
 - (1) Vergleich des Kurvenverlaufs der DFP-Abnahme bei Einsatz steigender Mengen von DFP in Ansätzen mit Serum und mit Puffer bei sofortiger Extraktion
 - (2) Vergleich des Verlaufs der DFP-Abnahme in Ansätzen mit Serum und mit Puffer bei gleicher Ausgangskonzentration

4. Zusammenfassung



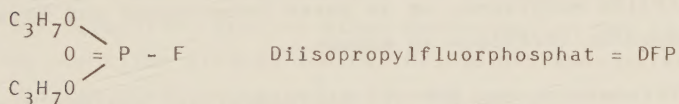
Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546217_0064

I Einleitung

Diisopropylfluorophosphat (DFP) ist ein Alkylester der Fluorophosphorsäure und gehört zu jenen giftigen Phosphorverbindungen wie Tabun, E 600, E 605, Soman und Sarin, die seit Anfang der dreißiger Jahre entdeckt und erforscht worden sind.

Vor dem Krieg untersuchte man die Anwendung der Organophosphate als Pestizide, während des 2. Weltkriegs erlangten sie als Kampfgase Bedeutung. Während dieser Zeit beschäftigte man sich besonders intensiv mit dieser Stoffgruppe. 1941 gelang MC COMBIE und SOUNDERS die Synthese von DFP, laut DIXON and NEEDHAM (1946) die giftigste aller Organophosphatverbindungen:



Die hohe Toxizität des DFP kommt durch die Hemmung der Cholinesterase zustande (MACKWORTH 1942). Es entsteht das Bild einer Acetylcholinvergiftung mit Symptomen wie Muskelfaszikulieren, starke Miosis, Akkomodationsstörungen etc. Durch DFP werden auch ataktische Symptome und Verhaltensstörungen ausgelöst, die nicht mit der Anhäufung von Acetylcholin erklärt werden können (ELL 1979).

Nach dem Krieg besann man sich auf die friedliche Nutzung der "C-Waffe" DFP. Als Inhibitor der Cholinesterase wurde der Einsatz von DFP bei Myasthenia gravis-Patienten versucht. Um eine signifikante Zunahme der Muskelkraft der gesamten Muskulatur zu erzielen, mußte jedoch bei der intramuskulären Injektion eine so hohe Dosis appliziert werden, daß systemische Nebenwirkungen auf das Zentralnervensystem, den Gastrointestinaltrakt und die Muskulatur nicht vermieden werden

konnten. DFP ist daher als Therapeutikum bei Myasthenia gravis zugunsten Neostigmin verlassen worden (ELL 1979).

Auch auf dem ophthalmologischen Sektor fand DFP Anwendung. Es bewirkte eine drastische Senkung des Augeninnendrucks und wurde zur Therapie des Glaukoms eingesetzt. Aber auch hier zeigten sich bei längerer Applikation unangenehme Nebenwirkungen wie verschwommenes Sehen und Akkommodations-schwierigkeiten und eine erhebliche Senkung der Cholin-esteraseaktivität im Plasma (ELL 1979).

Bei der Diagnose und Therapie des konvergenten Strabismus bei Hypermetrie erwies sich DFP als gutes Hilfsmittel.

Die irreversible Bindung von DFP an bestimmte Proteine konnte ebenfalls für wissenschaftliche Zwecke nutzbar gemacht werden. Mit radioaktivem DFP³² ließen sich Enzyme und Zellen markieren, um so deren Lebensdauer und Verteilungsmuster verfolgen zu können.

Die Verbreitung von DFP als Medikament war mit der großen Gefahr der versehentlichen Vergiftung verknüpft. Es fanden sich probate Antidota wie Atropin (symptomatisch) als Parasympathicolytikum und Toxogonin (kausal) als Cholinesterase-aktivator.

Heute kommt DFP als Medikament unter den Namen Fluostigmin, Diflupil und Floropryl nur noch bei Strabismus convergens (GELLMANN 1964) und bei therapieresistentem Glaukom als Mittel 2. Wahl in Betracht (FORTH et al. 1975).

II Physikalische und chemische Eigenschaften des DFP

1. Physikalische Eigenschaften

DFP wurde in den vierziger Jahren zum ersten Mal synthetisch hergestellt, es kommt natürlich nicht vor. Unter Normalbedingungen befindet sich DFP in flüssigem Zustand. Die Löslichkeit von DFP in Wasser ist sehr gering: In 100 ml Wasser können bei 20° C nur 1,5 g DFP gelöst werden. Im medizinischen Bereich wird DFP in Erdnußöl gelöst (QUILLIAM 1947, RAMACHANDRAN 1971). In Aceton, Äther, Alkohol, Benzin und Tetrachlorkohlenstoff ist DFP gut löslich. In wäßriger Lösung wird DFP verhältnismäßig rasch hydrolysiert: die Halbwertszeit beträgt 16 Stunden, während es in Erdnußöl nur langsam zerfällt.

In niedrigen Konzentrationen ist DFP in Dampfform unsichtbar und geruchlos. Erst ab einer Konzentration von ca. 0,4 mg pro Liter wird es von der Hälfte der Kontaktpersonen als süßlich-pfefferminzartig riechend wahrgenommen (SILVER 1948).

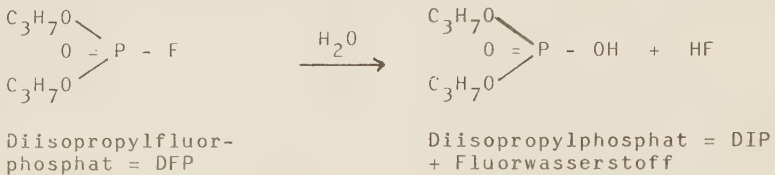
Zusammenfassung der physikalischen Eigenschaften von DFP (SILVER 1948):

Physikalischer Zustand:	flüssig
Schmelzpunkt:	unter 50° C
Siedepunkt:	bei 760 mm Hg 183° C bei 10 mm Hg 63° C
Dichte:	annähernd 1.07
Dampfdruck:	für 20° C: p = 0.97 mm Hg
Sättigungskonzentration in Luft bei 20° C	9.7 mg/l

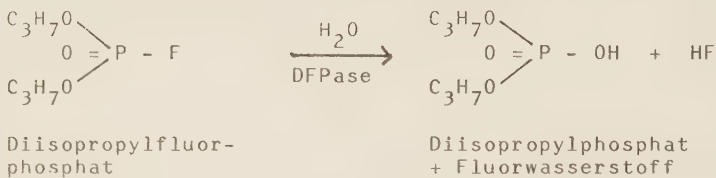
2. Chemische Eigenschaften

In vivo bestehen für DFP drei verschiedene Reaktionsmöglichkeiten: die spontane Hydrolyse, die enzymatische Hydrolyse und die Bindung an Proteine.

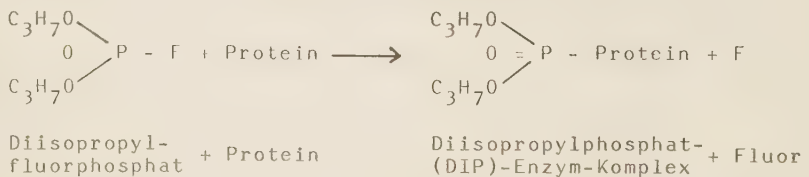
a) Spontane Hydrolyse



b) Enzymatische Hydrolyse (MOUNTER et al. 1954b)



c) Bindung an ein Protein (COHEN and WARRINGA 1954)



Zu a) Spontane Hydrolyse

In wäßriger Lösung wird DFP - bei einer Halbwertszeit von ca. 16 Stunden - relativ langsam gespalten, so daß diese Spontanhydrolyse bei Untersuchungen in vivo vernachlässigt werden kann, weil im letzteren Fall die rasch

erfolgende Spaltung durch proteolytische Enzyme und durch die DFPase eine weitaus größere Rolle spielt (LATKI et al. 1961).

Zu b) Enzymatische Hydrolyse

Ausführliche Angaben hierzu siehe Kapitel V.

Zu c) Bindung an ein Protein

Von Interesse sind besonders jene Bindungen an Proteine, die enzymatische Wirkung haben, was eine Blockade des beteiligten Enzyms nach sich ziehen und somit Ausgangspunkt der therapeutischen und auch toxischen Wirkung des DFP sein kann. DFP reagiert mit einigen Esterasen stöchiometrisch, d.h. ein Molekül DFP reagiert mit dem Aminosäurerest aus dem aktiven Zentrum des Enzyms. Bei Zunahme der Temperatur um 10 Grad verdoppelt sich die Reaktionsgeschwindigkeit (NACHMANSON 1947, 1948). Auch der pH-Wert des Milieus, in dem sich die Reaktion vollzieht, beeinflusst die Geschwindigkeit; der optimale pH-Wert für die meisten Esterasen liegt zwischen 7.8 und 8.1 (MOUNTER et al. 1957).

Die Bindung zwischen DFP und Proteinen, die keine DFPase-Eigenschaft besitzen, ist nach einer kurzen Latenzphase irreversibel. Sie wird erst wieder gelöst, wenn das an DFP fixierte Protein verstoffwechselt wird (COHEN and WARRINGA 1954).

Nach Meinung von OOSTERBAAN et al. (1958), WÄHLBY (1968), WÄHLBY et al. (1966, 1968) reagiert DFP bei der mit einer Enzymhemmung einhergehenden Bindung an ein Enzym mit einem Serinrest im aktiven Zentrum des Enzyms. Es sind drei verschiedene Theorien aufgestellt worden über den Übergang einer lockeren in eine irreversible DFP-Bindung, auch als ageing process oder "Alterung" bezeichnet. MOON et al. (1965) postulieren eine durch das Substrat bedingte Änderung der Enzymstruktur, deren Bindung an das DFP vor Abschluß der Phosphoryllierung noch reversibel sei.

WOOTON et al. (1960) dagegen vertreten die Ansicht, daß es während des ageing process zu einer Wanderung des DFP vom Imidazolring des Histidins zu einem benachbarten Hydroxylradikal eines nicht N-terminalen Serinrestes kommt.

BEHRENDTS et al. (1959) und JANSZ et al. (1959) kommen zu dem Ergebnis, daß es nach der Bindung von DIP an Serin zu einer Abspaltung einer Isopropylgruppe kommt und schließlich nur noch Monoisopropylphosphorylserin ungebunden im Serum nachzuweisen ist. Der ageing process würde durch die Abspaltung der Isopropylgruppe vollzogen werden.

d) Katalysatoren der Hydrolyse des DIP-Enzym-Komplexes

KEWITZ et al. (1957) hatten als erste gezeigt, daß PAM, Pyridin-2-aldoximmethiodid, in der Lage ist, die DIP-Enzym-Bindung (siehe unter c) S.4) zu lösen und damit das blockierte Enzym zu reaktivieren. Weitere Oxime als spezifische Antidota gegen DFP-Intoxikationen sind 2-PAM, 2-Formyl-1-methyl-pyridiniumchlorid (RAMACHANDRAN 1967), DAM, Diacetylmonoxim (BERNADON et al. 1974), MINA, Monoisonitrosoaceton (BERNADON et al. 1974) und Toxogonin^R, Bis-(4-hydroxiaminomethyl-pyridinium-1-methyl)äther-dichlorid (SCHLAACK 1966, OHNESORCE et al. 1970, RUMP et al. 1975). Letztere Substanz besitzt den Vorteil, 80 % des blockierten Enzyms zu reaktivieren gegenüber dem bis dahin gebräuchlichen MINA, das nur 30 % freisetzen konnte. Außerdem kann das Toxogonin im Gegensatz zu anderen Substanzen auch die Blut-Liquor-Schranke passieren.

Zu den weiteren Reaktivatoren gehören die quaternären Salze des Imidazolium-Jodids. Metallionen wie Mn^{++} und Mg^{++} können durch Komplexbildung mit den Oximen die Reaktivierung bedeutend beeinflussen.

III Pharmakologische Eigenschaften des DFP

1. DFP als Cholinesterasehemmer

a) Hemmung von Pseudo- und Aliesterasen

Schon 1942 erkannte MACKWORTH als Ursache der extremen Toxizität des DFP die Eigenschaft, die Cholinesterase zu hemmen. Erwartungsgemäß fanden sich bei Tieren, die mit DFP vergiftet waren und die entsprechende Vergiftungssymptome zeigten, stark erniedrigte Cholinesterasewerte.

Andererseits stellte man bei Versuchspersonen mit gering ausgeprägten Vergiftungssymptomen ebenfalls einen enormen Abfall der Cholinesterase fest. Eine Erklärung fand diese Diskrepanz in der Versuchsanordnung. Zur Feststellung der Cholinesteraseaktivität wurde Acetylcholin als Substrat gewählt. Acetylcholin wird im Organismus fast ausschließlich durch die Cholinesterase gespalten, in vitro jedoch auch vor allem durch die Pseudocholinesterasen und Aliesterasen, die zu DFP eine erhöhte Affinität aufweisen. Erniedrigte Cholinesterasewerte lassen nur dann einen Schluß auf die Schwere der Vergiftung mit DFP zu, wenn gleichzeitig der Anteil der Pseudo- und Aliesterasen, der von Spezies zu Spezies schwankt, berücksichtigt wird (TANABE et al. 1971).

b) Die Hemmung der Cholinesterase im Gehirn

Während eine massive Blockade der Acetylcholinesterase im Plasma keinesfalls zwangsläufig eine klinische Symptomatik bedingt (KOELLE et al. 1946a), findet sich eine hohe Korrelation zwischen dem klinischen Schweregrad der Vergiftung und der Reduktion der Cholinesteraseaktivität im Gehirn (FREEDMAN et al. 1949).

Erstaunlicherweise regeneriert sich die blockierte Acetylcholinesterase schon innerhalb von 48 Stunden zu einem grossen Teil, obwohl die biologische Halbwertszeit z.B. für die Pseudocholinesterase 16 Tage beträgt (MUNKNER et al. 1961).

Der Mechanismus ist noch unbekannt. Im Anschluß an diese schnelle Regenerationsphase folgt ein langsamer, aber stetiger Aktivitätszuwachs, der - wie in anderen Geweben auch - auf dem physiologischen Ersatz der blockierten Enzyme beruht und etwa nach drei Monaten beendet ist (FREEDMAN et al. 1949, KOELLE et al. 1946b).

2. Eigenwirkung des DFP - unabhängig von der Cholinesterasehemmung

Bei einer Vergiftung mit DFP sind die meisten klinischen Symptome auf eine Intoxikation mit Acetylcholin zurückzuführen, das nach einer Hemmung der Acetylcholinesterase nicht mehr abgebaut wird. Es gibt jedoch einige Wirkungen, die direkt auf das DFP zurückzuführen sind, was sich durch eine gleichzeitig Gabe von DFP plus Toxogonin und Atropin beweisen läßt.

Bei einer Untersuchung durch NAESS (1956) konnte mit einer sehr hohen DFP-Gabe über eine indirekte Stimulation keine Muskelkontraktion mehr ausgelöst werden. Da diese Blockade mit hohen Mengen Acetylcholin allein nicht zu erreichen war und die Blockade durch Auswaschen von DFP aufgehoben wurde, ohne daß die Cholinesteraseaktivität angestiegen wäre, vermutete NAESS eine reversible Bindung des freien DFP an Rezeptoren und eine daraus resultierende nikotinähnliche Wirkung.

Neben dieser stimulierenden Wirkung kann es bei entsprechend hoher Dosis auch zur Blockade des N. vagus kommen (VERBEKE 1949). Die DFP-Wirkung ist also von der Dosis abhängig. Eine kleine Dosis bewirkt einen acetylcholinähnlichen, eine große Dosis einen nicotinähnlichen Effekt.

Außerdem besitzt DFP eine weitere pharmakologische Wirkung: Durch eine extreme Säurebildung bei der enzymatischen Hydrolyse des DFP durch die sog. "Squid-head-DFPase" (HOSKIN 1971, DETTBARN et al. 1975), z.B. im Kopfganglion des Tintenfisches, werden hohe Konzentrationen an Fluoriden frei. Durch diese Ansäuerung des Gewebes kann die Reizleitung unterbrochen werden.

Klinische Zeichen einer Intoxikation mit DFP

Die Symptome einer Intoxikation mit DFP sind Ausdruck der Acetylcholinesteraseblockade und der daraus resultierenden Acetylcholinvergiftung. Darüber hinaus zeigten sich jedoch bei Versuchen mit Hennen und Ratten ataktische Störungen und Verhaltensabweichungen in den quantitativen Ernährungsgewohnheiten, die nicht mit der Cholinesterasehemmung erklärt werden können (JOHNSON et al. 1970).

Bei der akuten Intoxikation treten spontane Muskelfaszikulationen auf, die in eine allgemeine Muskelschwäche münden. Gleichzeitig kommt es zu einer Hypersalivation, Miosis, Diarrhoe und spontanem Urinabgang. Krampfanfälle und Atemlähmung (HORTON et al. 1946) können innerhalb weniger Stunden zum Tod führen.

Die chronische Intoxikation mit geringen DFP-Mengen, die wesentlich unter der LD_{50} liegen, bewirkt außer gelegentlichen Muskelfaszikulationen und Symptomen einer geringfügigen Acetylcholinvergiftung kaum irgendwelche Veränderungen (KOELLE et al. 1946b). Bei etwas höheren Dosen, über einen längeren Zeitraum verabreicht, vermischen sich die Zeichen einer akuten und chronischen Intoxikation. Beschwerden seitens des Zentralnervensystems wie emotionale Labilität, Tremor, motorische Unruhe, Kopfschmerzen etc. rufen auch deutliche Veränderungen im EEG als Ausdruck einer erhöhten neuronalen Aktivität hervor (GROB et al. 1947). Sehstörungen und eine starke Miosis stehen im Vordergrund (ELL 1979).

Therapie von Intoxikationen mit DFP

Ziel der Therapie ist es, entweder durch eine vorausgehende reversible Blockade die Cholinesterase vor der endgültigen Hemmung durch DFP zu schützen (z.B. mit HDMPPA = Hexan-1,6-bis(N,N-dimethyl-N-3-phthalimidopropylammonium)dibromid) oder die feste Bindung von DIP an die Cholinesterase zu lösen, z.B. mit Toxogonin^R = Obidoxim-hydrochlorid (LATKI et al. 1961,

FLEISCHER et al. 1960, KEWITZ 1957, KEWITZ et al. 1957) oder die Folgen des Anstiegs des Acetylcholins mit Atropin zu mildern, das die Rezeptoren der motorischen Endplatte reversibel blockiert. Am wirksamsten erweist sich eine Kombination von allen drei Maßnahmen, wobei der frühzeitige Einsatz der Therapie - möglichst in den ersten Stunden nach der Intoxikation - von ausschlaggebender Bedeutung ist. Zusätzlich zu Toxogonin, Atropin und HDMPPA empfehlen RUMP et al. (1975) die Gabe von Valium^R als Antikonvulsivum und CIMB (Natrium-3-chloro-2,5,6-trimethylbenzoat) über dessen Einfluß auf die motorische Endplatte als Schutz vor einer peripheren Atemlähmung.

Nach Behandlung mit Toxogonin und Atropin bestand für einen Schwervergifteten nach 3 Tagen keine Lebensgefahr mehr, nach 2 1/2 Wochen konnte er verhältnismäßig beschwerdefrei nach Hause entlassen werden (ELL 1979).

5. Einsatz von DFP als Medikament

In seiner Eigenschaft als Cholinesterasehemmer wurde DFP bei Myasthenia gravis (HARVEY et al. 1947, QUILLIAM 1947) eingesetzt, um somit eine Zunahme der Muskelkraft zu erreichen. Im Gegensatz zum Neostigmin zeigte sich beim DFP ein verzögerter Wirkungseintritt, dafür jedoch eine verlängerte Wirkungsdauer. Allerdings erwiesen sich bei der intramuskulären Injektion von DFP die systemischen Nebenwirkungen seitens des ZNS, des Gastrointestinaltrakts und der Muskulatur als zu gravierend, um DFP als Therapie der Wahl einzusetzen (GROB et al. 1947, COMROE et al. 1946).

Zur Senkung des Augeninnendrucks (LEOPOLD et al. 1946b) wurde DFP vor allem in den Fällen erfolgreich verwandt, wo Pilocarpin und Physostigmin versagten. Aber auch hier begrenzten Beschwerden des Patienten wie Augenschmerzen, reversible Linsentrübung und spastisch bedingte Akkommodations-schwierigkeiten den Einsatz bei Glaukom (LEOPOLD et al. 1946a, HARRISON 1960).

Die zur Aufhebung der Hypermetropie notwendige verstärkte Akkommodation erfolgte zentral und peripher. Bei zentral betonter Akkommodation tritt ein Strabismus convergens auf, der mit DFP behandelt werden kann, da DFP mit seiner parasympathischen Wirkung die periphere Komponente verstärkt (GELLMANN 1963, 1964). Bei Diagnose und Therapie des mit der Hypermetropie einhergehenden konvergenten Strabismus wird DFP trotz seiner nicht unerheblichen Nebenwirkungen als Mittel der Wahl empfohlen (GELLMANN 1963, 1964), sein Stellenwert als Therapeutikum - abgesehen vom bedingten Einsatz bei Glaukom - ist erheblich gesunken.

IV Kinetik von DFP im Organismus von Säugetieren

1. Verteilung im Blut

Anfangs der 50er Jahre gelang es COHEN and WARRINGA (1954) bei Patienten mit Myasthenia gravis, die mit DFP intramuskulär behandelt wurden, Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von markiertem DFP zu verfolgen. DFP³² reicherte sich innerhalb weniger Minuten im Blut an, erreichte nach 90 Minuten ein Maximum und verschwand dann rasch aus dem Blut. Sobald DFP in die Blutbahn gelangt ist, reagiert es sofort mit Plasmaproteinen, ebenso mit den Proteinen in der Blutkörperchenwand und in den durchbluteten Organen. Der Anteil des freien DFP im Blut nimmt innerhalb kürzester Zeit ab, nach einer Minute liegen bereits 85 % des im Serum befindlichen DFP in Form des proteingebundenen DIP vor (HANSEN et al. 1968). Die DFP-Konzentration im Blut ist umgekehrt proportional zur Bindungswilligkeit des DFP.

Die Bindung an Plasmaproteine ist irreversibel, an Erythrozyten und Gewebe jedoch nur locker, denn ein Teil des DFP läßt sich mit Pufferlösungen durch Auswaschen entfernen. Die Aufnahme von DFP in Gewebe und Erythrozyten ist nach etwa vier Stunden abgeschlossen (ELL 1979).

2. Verteilung im Gewebe

DFP wird von allen Geweben aufgenommen, es kommt allerdings nur in der Leber, der Lunge und der Niere zu einer Anreicherung (JANDORF and MC NAMARA 1950). In der Leber findet sich der größte Anteil proteingebundenen DIPs.

Im zerebralen Gewebe liegen die DFP-Konzentrationen weit unter der des übrigen Organismus, die Ursache ist unbekannt. Aufgrund seiner guten Lipidlöslichkeit wird in der myelinreicheren weißen Substanz mehr DFP gefunden als in der Großhirnrinde. Trotz seiner geringen Aufnahmekapazität ist das Gehirn extrem DFP-empfindlich. JANDORF et al. (1949) führten dies auf die Tatsache zurück, daß DFP im Gehirn ausschließlich mit Cholinesterasen reagierte, während sich DFP in anderen Geweben unspezifisch auch mit anderen Proteinen verband (MURACHI 1963).

3. Ausscheidung

Innerhalb des 1. Tages nach Applikation von DFP werden ein Drittel des P^{32} über den Urin ausgeschieden, ein weiteres Drittel in den darauffolgenden 9 Tagen; mit den Faeces werden zur gleichen Zeit nur ca. 5 % eliminiert. 5 bis 10 % der anfangs ausgeschiedenen Aktivität fanden sich als nicht metabolisiertes DFP, der Rest als DIP (COHEN and WARRINGA 1954).

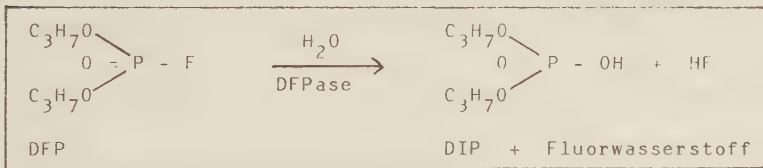
In den Geweben unterliegt DFP teils einer enzymatischen Hydrolyse, teils liegt es an Proteine gebunden vor. Hydrolysiertes DIP wird sofort über Urin und Faces ausgeschieden, ohne weiter metabolisiert zu werden (COHEN and WARRINGA 1954). In geringem Umfang - bei intravenöser Applikation - wird DFP auch über die Lunge abgeatmet.

V DFPase

1. Wirkungsweise der DFPase

Die Diisopropylfluorophosphatase besitzt die Fähigkeit, die Hydrolyse von Dialkylfluorophosphatverbindungen zu beschleunigen. Ihre systematische Bezeichnung lautet Di-Isopropyl-Phosphoro-Fluoridat-Fluorohydrolase, sie ist in der Enzymnomenklatur der Nummer 3.8.2.1 zugeordnet. Sie ist in ihrer Funktion eine Hydrolase, deren Angriffspunkt die Phosphor-Halogen-Bindung organischer Halogenverbindungen ist.

Die Reaktionsgleichung für die Hydrolyse des DFP durch die DFPase lautet:



Diese Hydrolyse von DFP zu Diisopropylphosphat (DIP) und Fluorwasserstoff läuft auch ohne enzymatische Unterstützung in wässriger Lösung spontan mit einer Halbwertszeit von 16 Stunden ab (ELL 1979). Im lebenden Organismus wird der überwiegende Teil der Dialkylfluorophosphatverbindungen jedoch enzymatisch abgebaut, wobei immer die Phosphor-Fluor-Bindung aufgebrochen wird, die Alkyl-Phosphoresterbindung bleibt intakt. MOUNTER et al. (1954b) konnte zeigen, daß bei der enzymatischen Hydrolyse von verschiedenen Dialkylfluorophosphatverbindungen pro Mol Substrat ein Mol Fluorwasserstoffsäure und ein Mol Dialkylphosphorsäure freigesetzt wird.

2. Substratspezifität der DFPase

Durch eine hochgereinigte Enzympräparation aus Schweineniere konnte die Hydrolyse von Monoestern der Alkylfluorphosphorsäure (u.a. Nervengifte wie Sarin, Soman, Tabun), Dialkyl-

fluorophosphate wie DFP oder DEFP (Diäthyl-fluorophosphat) enzymatisch katalysiert werden, wenngleich auch das Ausmaß der Katalysierung großen Schwankungen unterlegen war. Tri-alkylphosphatverbindungen ebenso wie Diäthyl-p-nitrophenylthionophosphat (PARATHION) erwiesen sich der DFPase gegenüber als resistent. Allerdings kann Paraoxon durch die DFPase, gewonnen aus Kaninchenserum, hydrolysiert werden (COHEN et al. 1957, MOUNTER 1963).

3. Einfluß des pH-Wertes auf die enzymatische Hydrolyse von DFP

Die Hydrolyse von DFP wird, wie alle enzymatischen Reaktionen, vom pH-Wert beeinflusst. Das pH-Optimum, bei dem der überwiegende Teil des Enzyms in seiner aktiven Form vorhanden ist, liegt bei 8,5 (ELL 1979).

4. Aktivatoren und Inhibitoren der Hydrolyse von DFP

Metallionen wie Magnesium, Mangan und Cobalt beschleunigen die Hydrolyse von DFP, wobei Mangan die größte Bedeutung zukommt (MOUNTER et al. 1953). Alle anderen Metallionen bewirken eine Enzymhemmung. Unter den Aminosäuren erwies sich Histidin vor Prolin und Cystein als sehr wirksamer Aktivator, der als Zusatz zum Enzym-Mangan-Gemisch die Enzymaktivität verdoppelt. Noch mehr als Histidin steigert 2,2 Dipyridol, eine stickstoffhaltige Verbindung, die nicht zu den Aminosäuren gehört, die Hydrolyserate (ELL 1979).

Bedingungen für eine optimale Hydrolyse im Enzym-Metall-Cofaktorgemisch (MOUNTER et al. 1953):

- a) dem Enzym muß das Metallion und der Cofaktor v o r dem Substrat zugesetzt werden.
- b) das Enzym-Metall-Cofaktorgemisch benötigt etwa 15 Minuten, bevor es seine volle Aktivität entfaltet.
- c) Cofaktor und Metallion müssen in äquimolaren Konzentrationen zugeführt werden.

Im Gegensatz zur Schweinenieren-DFPase gibt es im Kaninchen-serum eine DFPase, die auch Paraoxon hydrolysieren kann (MOUNTER 1954a). Das aktive Zentrum der DFPase stellt der Imidazolring des Histidins dar. Ob ein Enzym irreversibel durch DFP gehemmt wird oder ob es selbst als DFPase DFP zu DIP und Fluorwasserstoff zerlegt, hängt nur davon ab, ob es im Anschluß an die Bindung an den Imidazolring zu einer Wanderung des DIP-Restes an ein benachbartes Hydroxylradikal eines Serinrestes kommt. Vom Serinrest wird DIP nicht mehr abgespalten, diese Bindung ist stabil (GREENBERG et al. 1962, HOKIN et al. 1964, JANSZ et al. 1959, OOSTERBAAN et al. 1958, WÄHLBY 1968 und WÄHLBY et al. 1966, 1968).

5. Vorkommen der DFPase

DFPase kommt in fast allen lebenden Organismen vor: in Viren, in den meisten Bakterien, in Tintenfischen, Reptilien, Vögeln und im Menschen. Im menschlichen Organismus weist die Leber den größten Gehalt an DFPase auf, gefolgt von Nieren und Dünndarmmukosa. Nachweisbar - wenn auch in geringen Mengen - ist das Enzym jedoch in allen Geweben (MOUNTER et al. 1955).

VI Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Abbau von DFP im menschlichen Serum in vitro bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen zu verfolgen und zu prüfen, wo sich ein Gleichgewicht einstellte und inwieweit bei unterschiedlicher Versuchsanordnung eine Enzymbeteiligung oder eine Proteinbindungskomponente zu berücksichtigen war. Die DFP-Abnahme wurde gaschromatographisch erfaßt.

VII Eigene Untersuchungen

1. Gaschromatographische Bestimmung des DFP

a) Prinzip

In der Literatur ist keine Bestimmungsmethode für DFP beschrieben. Sie mußte daher erarbeitet werden. Im vorliegenden Fall erfolgte sie nach Extraktion mit Benzol gaschromatographisch. Als innerer Standard diente Triäthylphosphat (TEP).

b) Geräte und Ausrüstung

- Gaschromatograph: Hewlett Packard 5840 mit NPFID und Integrator

Säule: Glas 1/4 Zoll, 3 ft, 10 % OV1
auf HP Chrom G AWD MCS

Gaschromatographische Arbeitsbedingungen:

- Trägergas	:	Helium, 30 ml/Min.
- Säulentemperatur:	:	140° C
- Injektor	:	240° C
- FID-	:	300° C
- Retentionszeit	:	Benzol 0,51 Min.
		DFP 1,04 Min.
		TEP 2,50 Min.

- Wasserbad Colora-Ultrathermostat NB 3 (Genauigkeit 1/10°C)

- Mikroliterspritze, Mikroliterpipetten (Eppendorf)

c) Verwendete Chemikalien und Lösungen

- DFP Reinsubstanz, Bezugsquelle Serva Heidelberg

- Benzol, Merck, p.a., Art. 1792

- Phosphatpuffer pH 7,4; Lösung A: Monokaliumphosphat KH_2PO_4
1/15 Mol, 9,073 g/l

Lösung B: Dinatriumphosphat Na_2HPO_4
1/15 Mol, 11,870 g/l

Lösung B (Dinatriumphosphat) wurde in ein Becherglas gegeben und dann wurde langsam unter ständigem Rühren Lösung A (Monokaliumphosphat) hinzugefügt, bis sich der benötigte Wert von pH 7,4 mit einem pH-Meter einstellen ließ.

- Standardlösung

Die Standardsubstanz Triäthylphosphat wurde dem Lösungsmittel Benzol zugesetzt: 500 μ g Triäthylphosphat pro 100 ml Benzol, c = 5 mg Triäthylphosphat / l Benzol

- Gewinnung des Serums

Es wurde vier Mal im Abstand von ca. 1 Woche 20 ml Vollblut von dem gleichen Probanden abgenommen. Etwa 30 Minuten nach der Blutentnahme wurde 15 Minuten lang bei 2000/Min. zentrifugiert und das überstehende, nicht hämolysierte Serum abpipettiert und im Kühlschrank aufbewahrt oder eingefroren. Das im Kühlschrank aufbewahrte Serum wurde innerhalb von 4 Tagen verwandt; die eingefrorenen Seren wurden jeweils unmittelbar vor Versuchsbeginn aufgetaut.

d) Arbeitsvorschrift

Es wurden jeweils zwei identische Meßansätze mit Serum und ein Leerwert (ohne Serum) hergestellt.

- Meßansatz mit Serum:

1 ml Serum + 1 ml Phosphatpuffer mit DFP
c = 0,2 mg bis 8 g/l Phosphatpuffer

- Meßansatz ohne Serum:

1 ml Phosphatpuffer + 1 ml Phosphatpuffer mit DFP
c = 0,2 mg bis 8 g/l Phosphatpuffer

Die Meßansätze wurden gut gemischt. Zur Extraktion wurden je Ansatz 0,2 ml entnommen und in ein weiteres Reagenzglas pipettiert, dann dazu 2 ml der Benzol-Standard-Mischung gegeben und mit dem Reagenzglasschüttler etwa 15 Sekunden gut durchmischt. Die Bindung der wäßrigen Phase erfolgte durch

Zusatz von 1,5 g Natriumsulfat. Die Probe wurde nochmals gut geschüttelt und vom Überstand 1 μ l in den Gaschromatograph eingespritzt.

Die Extraktionen wurden sofort nach Fertigstellung der Ansätze vorgenommen und in einem bestimmten zeitlichen Abstand fortgesetzt, um die Abnahme von DFP pro Zeiteinheit verfolgen zu können. Die Ansätze wurden in verschließbaren Reagenzschliffgläsern aufbewahrt und im Wasserbad bei 25° C gehalten.

e) Berechnung

Als innerer Standard wurde Triäthylphosphat gewählt. Es wurden die Peakflächen ausgewertet. Hierzu wurden steigende Konzentrationen von DFP in Benzol in den Gaschromatograph injiziert und eine Eichkurve aufgestellt. Es wurde über einen sehr großen Konzentrationsbereich gemessen; die Eichkurve verlief dabei nicht linear. Daher war eine Auswertung über einen Umrechnungsfaktor nicht möglich. Eine zusätzliche Schwierigkeit ergab sich durch Schwankungen in der Empfindlichkeit des Detektors von Tag zu Tag. Die Eichkurve wurde deshalb jeweils für den zu bestimmenden Konzentrationsbereich täglich neu erstellt und durch Testeinspritzungen kontrolliert. Die Konzentrationen des DFP in den Analysen wurden aufgrund der ermittelten Peakflächen der Eichkurve entnommen.

f) Präzision

Von einem wie oben beschrieben hergestellten Meßansatz ($c = 8$ mg DFP/l Phosphatpuffer) wurden jeweils 0,2 ml abpipettiert, wie bereits geschildert extrahiert und dann in den Gaschromatograph injiziert. Bei 10 Einzelbestimmungen ergab sich hierbei eine relative Standardabweichung v_k von 2,50.

Präzision		
Konzentrationen der 10 Einzelbestimmungen (mg/l)		
8,1		
8,2		
8,2	$\bar{x} =$	8,0
8,2	$s =$	0,2
8,1	$v_k =$	2,5
8,0		
7,8		
7,9		
7,7		
7,7		

Weiter wurden 5 verschiedene Meßansätze der gleichen Konzentration ($c = 8 \text{ mg/l}$) in der Pufferlösung angesetzt und pro Ansatz 2 Proben eingespritzt.

Ansatz	Probe	Konz. (mg/l)	
I	1	0,82	
	2	0,80	
II	1	0,86	$\bar{x} =$ 0,80
	2	0,80	
III	1	0,78	$s =$ 7,79
	2	0,79	$v_k =$ 4,43
IV	1	0,73	
	2	0,79	
V	1	0,84	
	2	0,80	

g) Ermittlung der zur Extraktion geeigneten Natriumsulfatmenge

Bei dieser Untersuchung sollte die geeignete Menge Natriumsulfat zur optimalen Bindung der wäßrigen Phase gefunden werden. Hierzu wurde mehrfach nach Zusatz steigender Mengen von Natriumsulfat extrahiert ($c = 2 \text{ mg DFP/l Aqua dest.}$)

Zusatz von Natriumsulfat (g)	DFP wiedergefunden (mg/l)
0,5	1,81
1,0	1,84
1,5	2,00
2,0	1,36

Der Zusatz von $1,5 \text{ g Na}_2\text{SO}_4$ erwies sich als die geeignetste Menge.

h) Eichkurve

Die Eichkurve verläuft nur in den unteren Konzentrationsbereichen (bis 16 mg/l) linear. Wegen des großen Meßbereichs ((1 mg bis 8 g/l) wurde die doppelt logarithmische Darstellung gewählt. Aus der Eichkurve kann zu jedem Area-Betrag die entsprechende DFP-Konzentration abgelesen werden (siehe Tabelle 1 und Abbildung 1, S.21).

Tabelle 1: Wertetabelle zur Eichkurve

Konzentration	Area
1 mg/l	225
2 mg/l	450
4 mg/l	900
8 mg/l	1.850
16 mg/l	3.700
32 mg/l	7.000
100 mg/l	18.000
200 mg/l	33.000
400 mg/l	58.000
800 mg/l	100.000
1 g/l	119.000
2 g/l	200.000
4 g/l	324.000
8 g/l	486.000

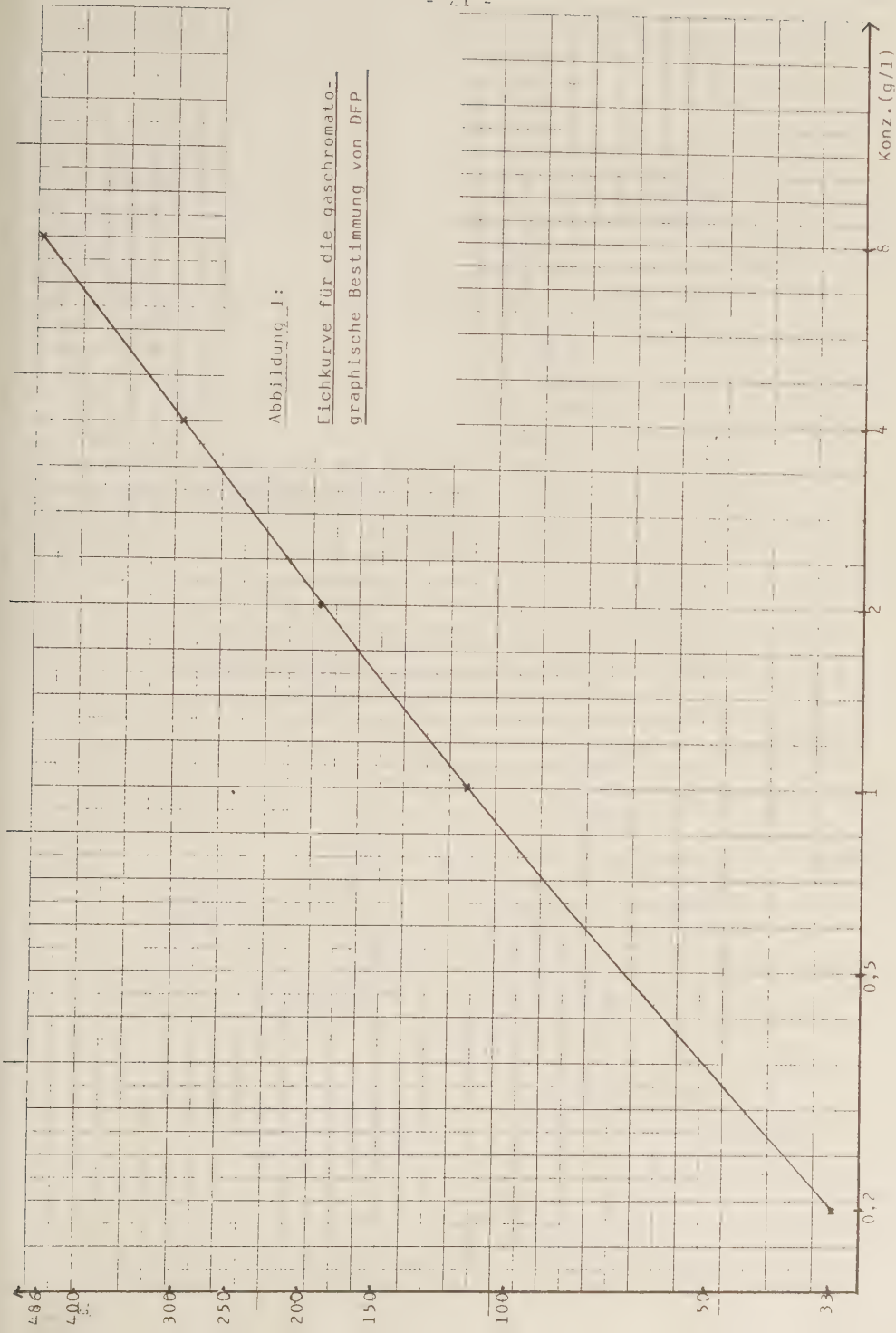


Abbildung J:

Eichkurve für die gaschromato-
graphische Bestimmung von DFP

i) Wiederfindung

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden über den Konzentrationsbereich von 8 mg bis 2 g DFP/l Puffer bzw. Benzol zwei verschiedene Verfahrensweisen, DFP zu extrahieren, verglichen.

Ansatz I : DFP wurde in Puffer gelöst und mit dem Benzol-Standard-Gemisch und Natriumsulfat nach dem üblichen, oben beschriebenen Verfahren extrahiert. Dieser Ansatz entspricht dem Standardansatz für alle Bestimmungen von DFP in Serum bzw. in Puffer im Rahmen dieser Arbeit.

Ansatz II: DFP wurde sofort im Benzol-Standard-Gemisch gelöst und nach Zusatz von Natriumsulfat extrahiert. Im Vergleich zu Ansatz I sollte überprüft werden, welcher Prozentsatz an DFP durch die vorherige Lösung in Puffer verlorengeht.

In der folgenden Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Ansätze I und II für die jeweilige Konzentration gegenübergestellt.

Tabelle 2: Wiederfindung

ANSATZ I		ANSATZ II	
Konz. in Puffer = Istwert		Konz. in Benzol = Sollwert	
c = 2 mg/l		c = 2 mg/l	
Probe 1	1,61 mg	Probe 1	1,96 mg
Probe 2	1,80 mg	Probe 2	2,06 mg
Probe 3	<u>1,79 mg</u>	Probe 3	<u>2,00 mg</u>
$\bar{x}$	<u>1,73 mg</u>	$\bar{x}$	<u>2,00 mg</u>
Wiederfindung		87 %	
c = 2 g/l		c = 2 g/l	
Probe 1	1,84 g	Probe 1	1,96 g
Probe 2	1,81 g	Probe 2	2,00 g
Probe 3	<u>1,86 g</u>	Probe 3	<u>2,04 g</u>
$\bar{x}$	<u>1,84 g</u>	$\bar{x}$	<u>2,00 g</u>
Wiederfindung		92 %	

Die Wiederfindung betrug im Mittel 90 %.

2. Untersuchungsergebnisse:

Vergleich des DFP-Verlustes in Ansätzen mit Serum und mit Puffer

- a) Gegenüberstellung des DFP-Verlustes innerhalb von 10 sec. bei niedrigen Konzentrationen von DFP in Ansätzen mit Serum und mit Puffer

Bei diesem Versuch wurden identische Mengen von DFP einerseits in Serum, andererseits in Puffer gegeben. Es sollte die nach 10 Sekunden eintretende Wirkung des Serums auf DFP geprüft werden. Nach der Zugabe zu Serum mußte umgehend extrahiert werden, weil bei niedrigen Konzentrationen innerhalb von Minuten das DFP abgebaut bzw. gebunden wird und somit im Chromatogramm kein Peak mehr zu erhalten war.

Tabelle 3: DFP-Verluste innerhalb von 10 sec. bei niedrigen Konzentrationen von DFP in Ansätzen mit Serum und mit Puffer

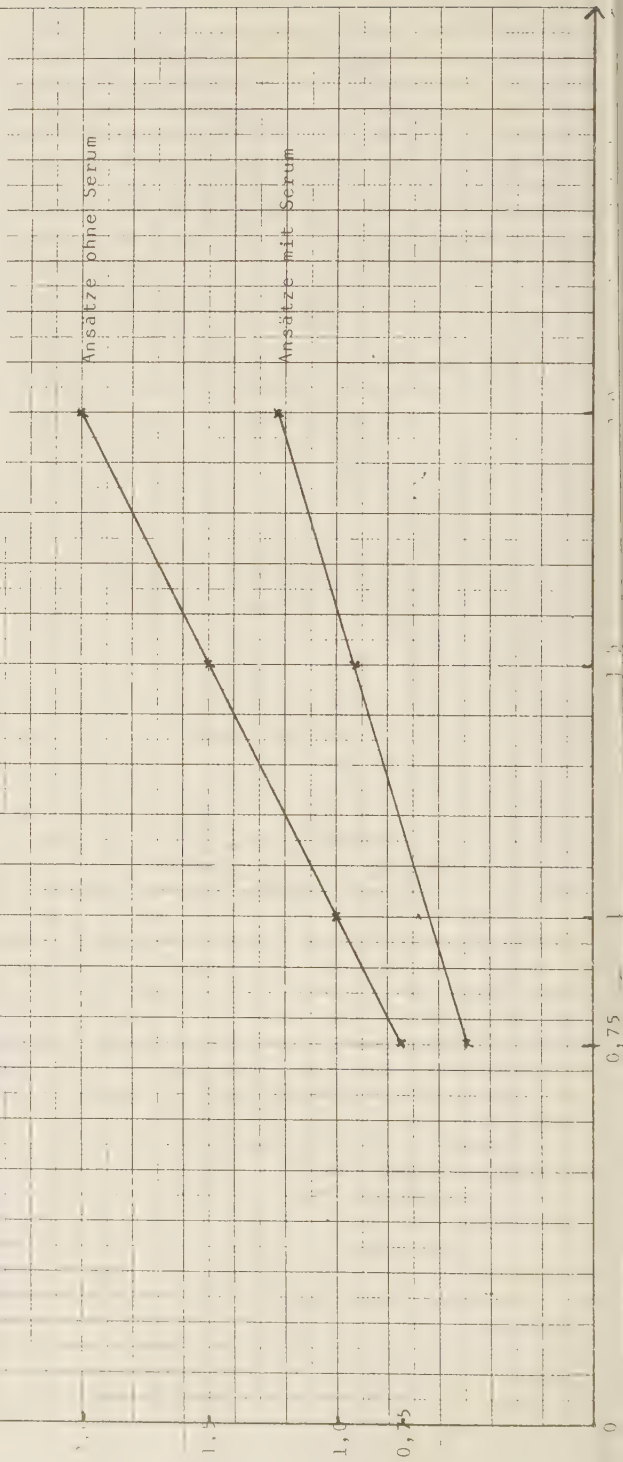
Eingesetztes DFP (mg/l)	Ansatz ohne Serum DFP-Konz. (mg/l)	Ansatz mit Serum DFP-Konz. (mg/l)	Konz. abfall
0,75	0,75	0,49	35 %
1,00	1,00	0,68	32 %
1,50	1,50	0,92	39 %
2,00	2,00	1,24	38 %

Die erhaltenen Werte sind auf dem Diagramm S.24 (Abb. 2) wiedergegeben. Man erkennt, daß die Extrahierbarkeit aus dem Ansatz mit Serum nach 10 Sekunden deutlich geringer ist, was auf die rasche Eiweißbindung von DFP zurückgeführt werden kann.

Abbildung 2:

Vergleich der Konzentrationsabnahme
von DFP in Ansätzen mit und ohne
Serum bei Extraktion nach 10 Sek.

Abgegebene
Konz. (mg/l)



- b) Zeitlicher Verlauf der DFP-Abnahme in Ansätzen mit Serum und mit Puffer

Um den Verlauf der DFP-Abnahme im Serum verfolgen zu können, wurden jeweils steigende Mengen von DFP mit Serum inkubiert und in bestimmten Zeitabständen extrahiert, bis chromatographisch kein DFP mehr ausgewiesen wurde.

(1) Ansätze von DFP in Serum

Im folgenden sind die Ergebnisse des zeitlichen Verlaufs der DFP-Abnahme bei steigenden Ausgangskonzentrationen an DFP dargestellt (DFP-Konzentrationsbereich von $c = 32 \text{ mg/l}$ bis $c = 1 \text{ g/l}$, Tabellen 4-9)

Tabelle 4

$c = 32 \text{ mg/l} = 1,7 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l}$			
Min.	Ansatz mit Serum DFP-Konz. (mg/l)	Abfall pro Zeiteinheit	Konzentration in % d. Ausgangskonz.
0	30,0		96
5	8,9	70 %	28
10	3,2	64 %	10
15	0,7	78 %	2
20	./.		./.

Tabelle 5

$c = 100 \text{ mg/l} = 5,4 \cdot 10^{-4} \text{ Mol/l}$			
Min.	Ansatz mit Serum DFP-Konz. (mg/l)	Abfall pro Zeiteinheit	Konzentration in % d. Ausgangskonz.
0	97,0		97
10	10,5	90 %	
20	./.		./.

Tabelle 6

c = 200 mg/l = $1,1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l			
Min.	Ansatz mit Serum DFP-Konz. (mg/l)	Abfall pro Zeiteinheit	Konzentration in % der Ausgangskonz.
0	194,0		97
10	19,7	90 %	10
20	1,5	92 %	1
30	./.		./.

Tabelle 7

c = 400 mg/l = $2,2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l			
Min.	Ansatz mit Serum DFP-Konz. (mg/l)	Abfall pro Zeiteinheit	Konzentration in % der Ausgangskonz.
0	392,0		98
10	77,1	81 %	19
20	8,5	89 %	2
30	0,8	91 %	1
40	./.		./.

Tabelle 8

c = 800 mg/l = $4,4 \cdot 10^{-3}$ Mol/l			
Min.	Ansatz mit Serum DFP-Konz. (mg/l)	Abfall pro Zeiteinheit	Konzentration in % der Ausgangskonz.
0	786,0		98
10	244,4	69 %	31
20	69,6	72 %	9
30	16,3	77 %	2
40	3,2	80 %	1
50	0,4	87 %	0,05
60	./.		./.

Tabelle 9

$c = 1 \text{ g/l} = 5,4 \cdot 10^{-3} \text{ Mol/l}$			
Min.	Ansatz mit Serum DFP-Konz. (mg/l)	Abfall pro Zeiteinheit	Konzentration in % d. Ausgangskonz.
0	980,0		98
10	485,0	50 %	51
20	166,0	64 %	17
30	88,0	47 %	9
40	22,0	75 %	2
50	4,0	82 %	0,4
60	0,4	90 %	0,04
70	./.		./.

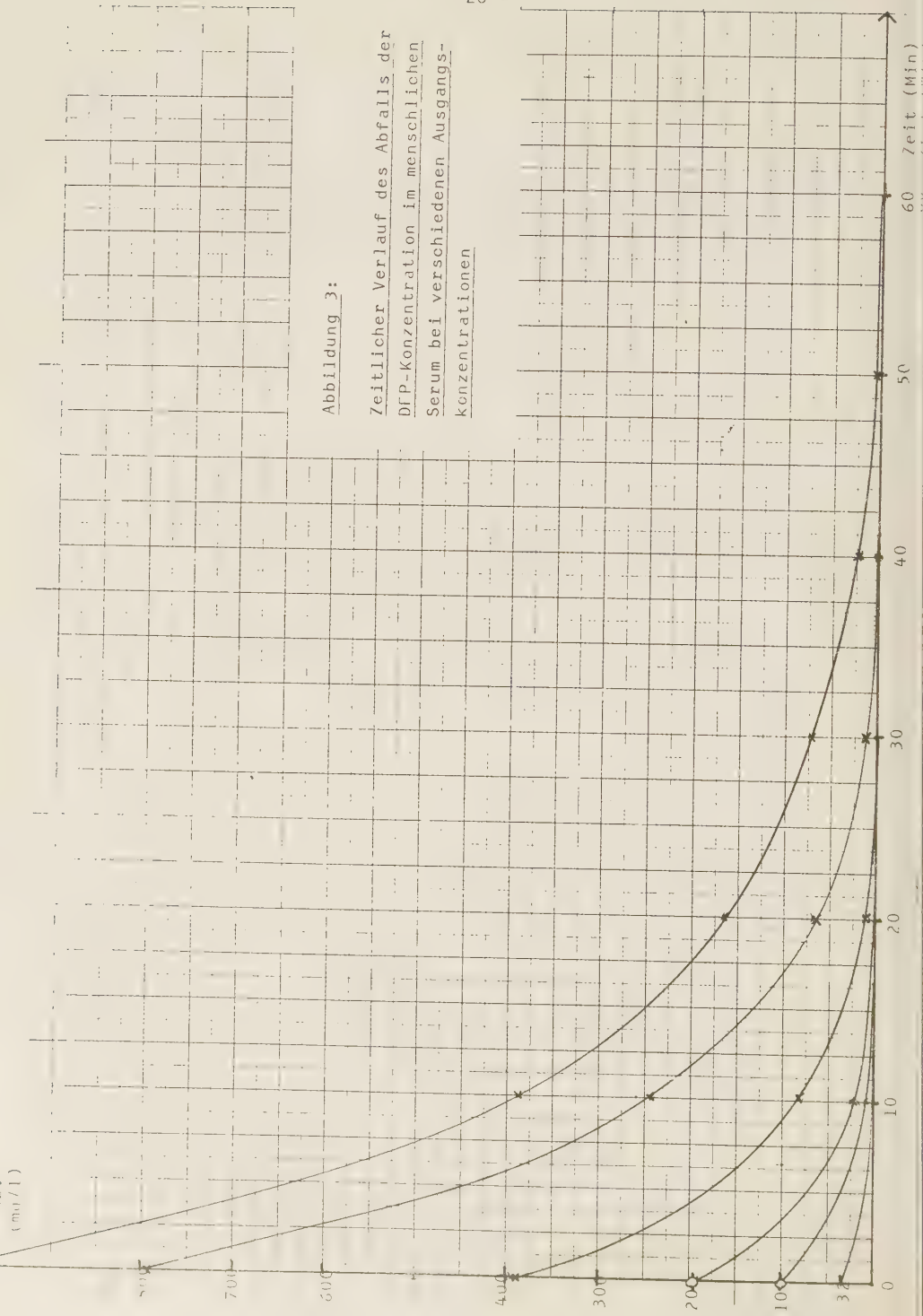
Die erhaltenen Werte der obigen Tabellen ($c = 32 \text{ mg/l}$ bis $c = 1 \text{ g/l}$) sind im Diagramm S.28 (Abb. 3) wiedergegeben. Letzteres zeigt, daß der Kurvenverlauf der DFP-Abnahme in etwa einer Reaktion 1. Ordnung entspricht.

Man erkennt, daß DFP im Serum nach einer von der Ausgangskonzentration abhängigen Zeit nicht mehr nachzuweisen ist, daß also das Gleichgewicht der Reaktion weit auf Seiten der Spaltprodukte liegt. Im Verlaufe des Versuchs wird bei einer gegebenen Ausgangskonzentration pro Zeiteinheit mengenmäßig immer weniger DFP, prozentual jedoch immer mehr abgebaut.

Zur richtigen Interpretation der erhaltenen Befunde ist jedoch noch der Verlust an freiem DFP pro Zeiteinheit bei Inkubation mit Puffer allein zu berücksichtigen. Dies geschieht im folgenden Abschnitt.

Abbildung 3:

Zeitlicher Verlauf des Abfalls der
DfP-Konzentration im menschlichen
Serum bei verschiedenen Ausgangs-
konzentrationen



(2) Ansätze von DFP in Serum und in Puffer

Hierzu wurden jeweils steigende Mengen von DFP einerseits in Serum und andererseits in Puffer inkubiert und in bestimmten Zeitabständen extrahiert, bis gaschromatographisch kein DFP mehr ausgewiesen wurde.

In den folgenden Tabellen 10 und 11 sind die Ergebnisse des zeitlichen Verlaufs der DFP-Abnahme bei steigenden Ausgangskonzentrationen in Ansätzen mit Serum und parallel dazu mit Puffer dargestellt (DFP-Konzentrationsbereich $c = 2 - 4 \text{ g/l}$).

Tabelle 10

$c = 2 \text{ g/l} = 1,1 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$ (AK = Ausgangskonzentration)						
Std.	Mit Serum			Ohne Serum		
	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeiteinheit	Konz. in % der AK	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeiteinheit	Konz. in % der AK
0	1,94		97	2,00		100
1	0,49	75 %	25	1,84	8 %	92
2	0,09	82 %	5	1,61	12 %	81
3	0,03	66 %	1,5	1,39	14 %	70
4	0,008	73 %	0,4	1,22	12 %	61
5	0,002	75 %	0,1	0,93	24 %	47
6	0,001	50 %	0,05	0,65	30 %	33

Die erhaltenen Werte der obigen Tabelle 10 ($c = 2 \text{ g/l}$) sind im Diagramm S.30 (Abb.4) wiedergegeben. Beim Vergleich der Kurvenverläufe der DFP-Abnahme in Serum bzw. in Puffer erkennt man, daß die "Mit-Serum"-Kurve exponentiell verläuft, dagegen diejenige "Ohne Serum" annähernd linear. Die prozentuale DFP-Abnahme pro Zeiteinheit bleibt bei beiden Versuchen - mit Serum bzw. mit Puffer - ziemlich konstant.

Konz. (g/l)

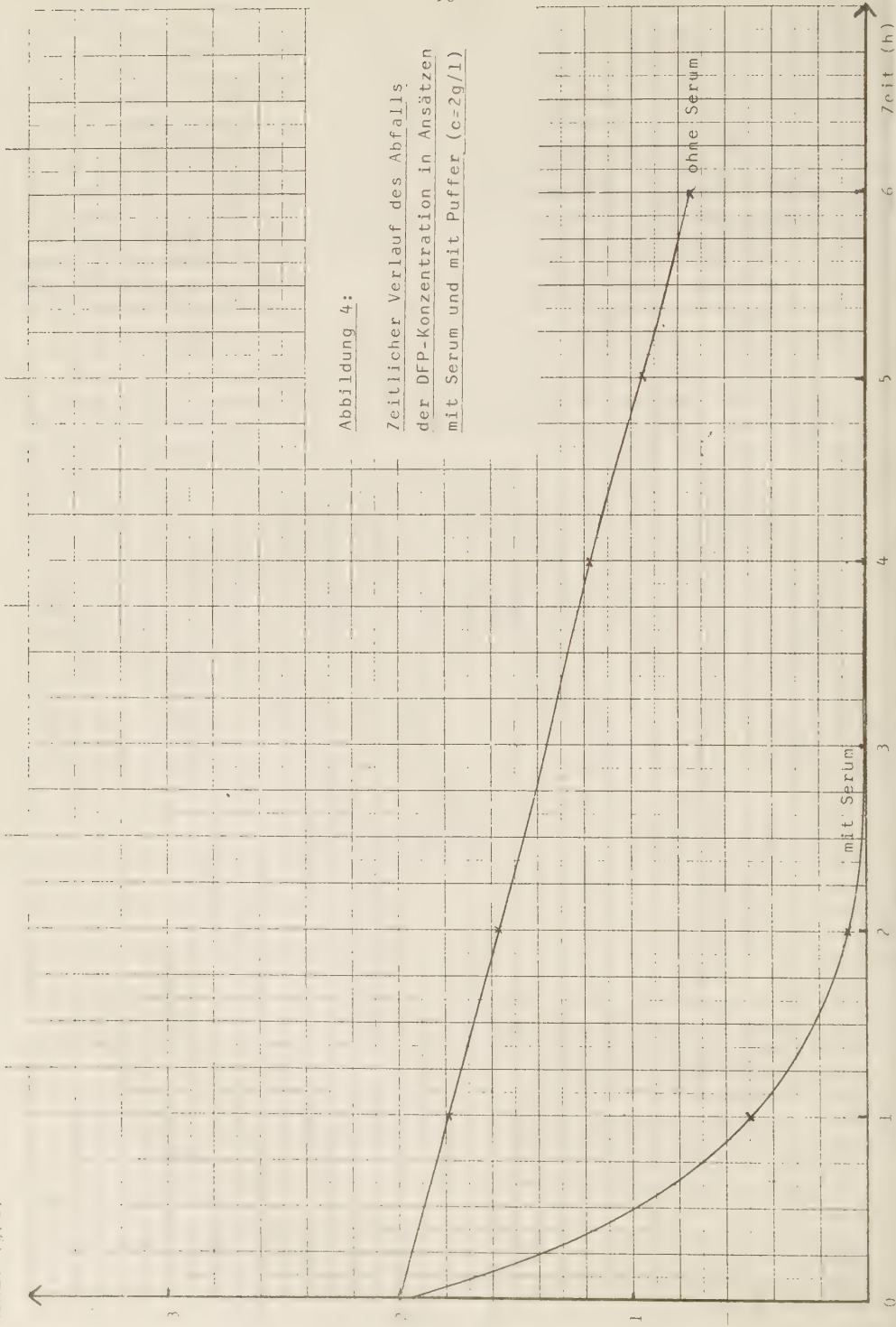


Abbildung 4:

Zeitlicher Verlauf des Abfalls
der DFP-Konzentration in Ansätzen
mit Serum und mit Puffer (c=2g/l)

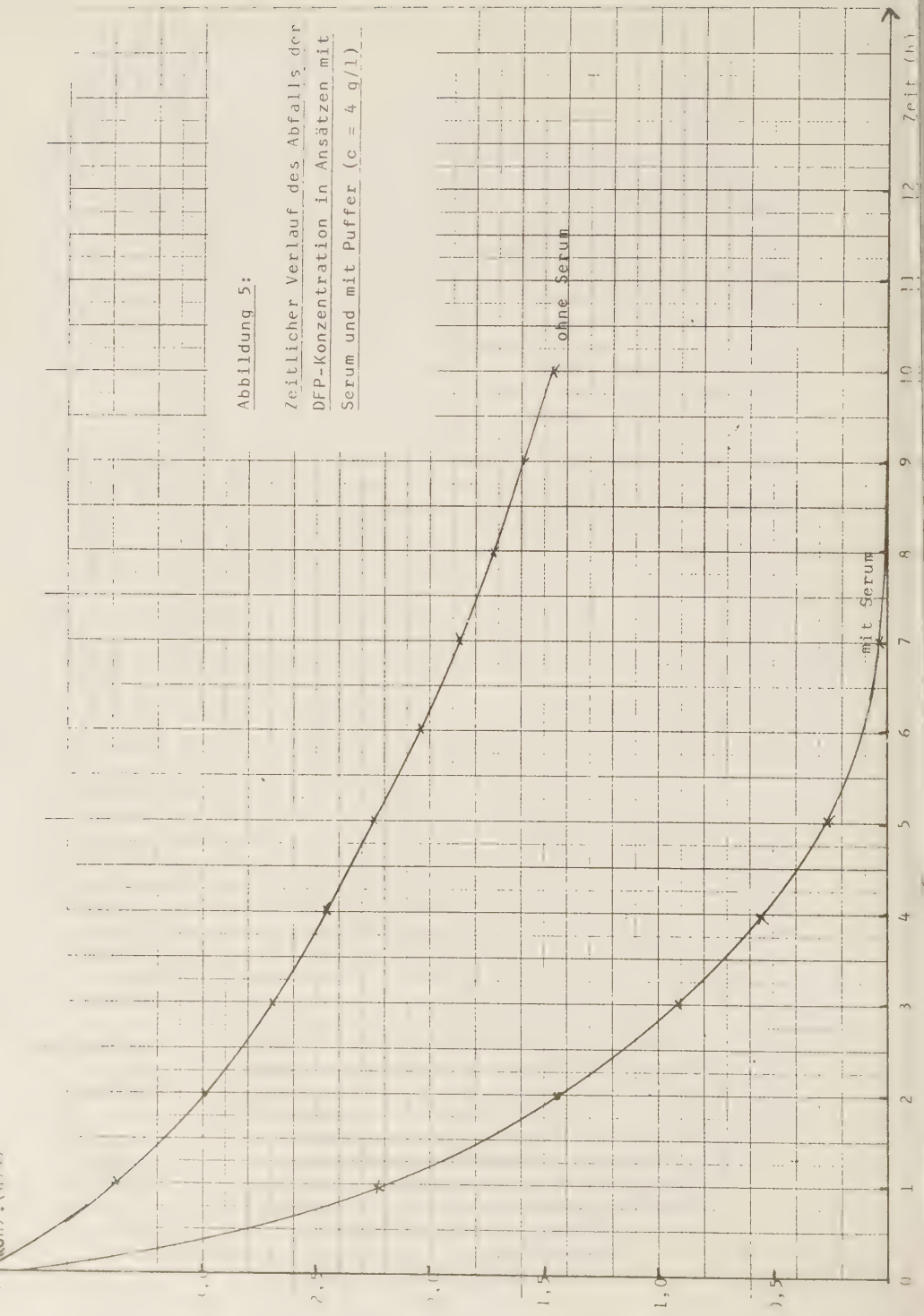
Tabelle 11

$c = 4 \text{ g/l} = 2,2 \cdot 10^{-2} \text{ Mol/l}$						
Std.	Mit Serum			Ohne Serum		
	Konz. g/l	Proz. Abfall pro Zeitinterv.	Konz. in % d. AK	Konz. g/l	Proz. Abfall pro Zeitinterv.	Konz. in % d. AK
0	3,84		96	4,00		100
1	2,23	42 %	56	3,38	15 %	85
2	1,44	35 %	36	2,95	12 %	75
3	0,90	37 %	23	2,80	6 %	70
4	0,61	32 %	15	2,59	7 %	65
5	0,40	34 %	10	2,40	7 %	60
6	0,25	37 %	6	2,30	6 %	58
7	0,10	60 %	3	2,05	11 %	51
8	0,02	80 %	0,5	1,55	10 %	46
9	0,004	80 %	0,1	1,67	10 %	42
10	./.			1,45	14 %	36
24				0,22	85 %	5,5

Für die Wertetabelle $c = 4 \text{ g/l}$ gilt das Gleiche wie für $c = 2 \text{ g/l}$. Jedoch verläuft die Kurve "Mit Serum" bei $c = 4 \text{ g/l}$ bedeutend flacher als bei $c = 2 \text{ g/l}$, wie aus dem Diagramm S.32 (Abb.5) zu ersehen ist.

Abbildung 5:

Zeitlicher Verlauf des Abfalls der
DFP-Konzentration in Ansätzen mit
Serum und mit Puffer ($c = 4 \text{ g/l}$)



c) Verlauf der DFP-Abnahme in vorher erhitztem Serum

(1) DFP-Abnahme in vorher erhitztem, unverdünnten Serum

Um festzustellen, welchen Effekt die Erhitzung des Serums auf den Abbau von DFP hat, wurden zwei Ansätze mit Serum 30 bzw. 60 Min. auf 55°C im Wasserbad erhitzt. Diesen Ansätzen wurde nach Abkühlung DFP in Puffer ($c = 2\text{g/l}$ Puffer) dazugegeben und der Abbau pro Stunde bei Zimmertemperatur (25°C) gemessen. Gleichzeitig lief ein Leerwert (DFP in Puffer statt in Serum) bei Zimmertemperatur mit.

Meßansatz I : 1 ml Serum 30 Min. bei 55°C erhitzt,
nach Abkühlung 1 ml Puffer + DFP ($c=2\text{g/l}$)
dazugegeben.

Meßansatz II : 1 ml Serum 60 Min. bei 55°C erhitzt,
nach Abkühlung 1 ml Puffer + DFP ($c=2\text{g/l}$)
dazugegeben.

Meßansatz III: 2 ml Puffer + DFP ($c = 2\text{ g/l}$) bei 25°C
(Leerwert, d.h. kein Serum, kein Erhitzen).

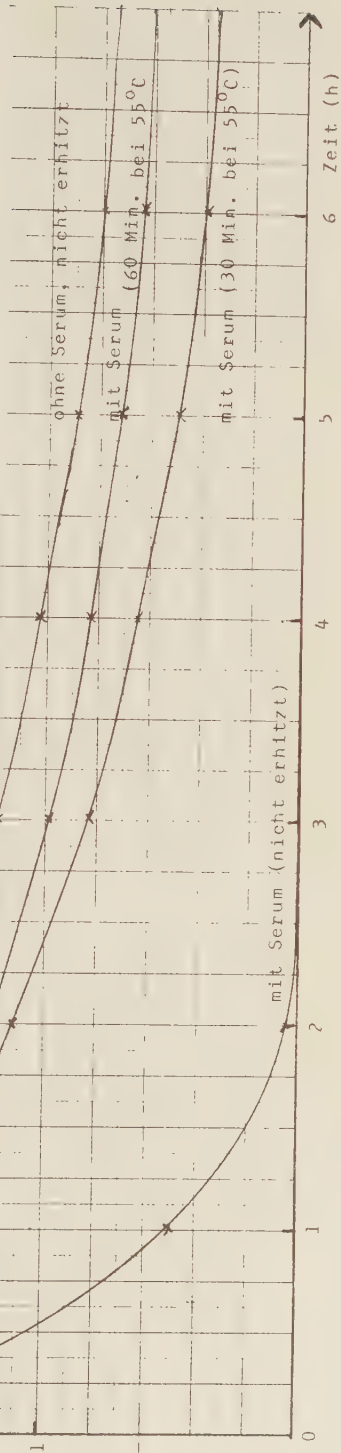
Die Tabelle 12 auf S.34 und das Diagramm S.35 (Abb.6) zeigen, daß die DFP-Abnahme durch die Erhitzung des Serums deutlich verlangsamt wird. Je länger das Serum erhitzt wurde, desto langsamer erfolgte die DFP-Abnahme. Dennoch nimmt das extrahierbare DFP auch im länger erhitzten Serum schneller ab als in der Pufferlösung.

Tabelle 12: DFP-Abnahme in vorher erhitztem, unverdünntem Serum

Std.	MEßANSATZ I			MEßANSATZ II			MEßANSATZ III		
	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeiteinheit	DFP-Konz. in % d. AK	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeiteinheit	DFP-Konz. in % d. AK	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeiteinheit	DFP-Konz. in % d. AK
0	1,74	17 %	87	1,73	20 %	87	2,00	15 %	100
1	1,44	24 %	72	1,39	9 %	70	1,70	18 %	85
2	1,09	18 %	54	1,27	22 %	64	1,39	11 %	70
3	0,89	21 %	45	0,99	7 %	49	1,24	17 %	62
4	0,70	21 %	35	0,92	16 %	46	1,03	8 %	52
5	0,55	13 %	28	0,78	14 %	39	0,95	7 %	48
6	0,48	33 %	24	0,67	11 %	34	0,88	12 %	44
7	0,32		16	0,60		30	0,77		39

Abbildung 6

Erhitzung des Serums auf 55°C
30 bzw. 60 Min. ($c = 2 \text{ g/l}$)



- (2) Verlauf der DFP-Abnahme in bereits mit Puffer verdünntem und dann erhitztem Serum

Die Versuchsanordnung ist fast identisch mit der des vorhergehenden Versuchs (siehe S.33), nur wird hier nicht das Serum allein, sondern das mit Puffer verdünnte Serum erhitzt.

Zwei identische Ansätze mit Serum - mit Puffer verdünnt - wurden 30 bzw. 60 Min. bei 55° C im Wasserbad erhitzt. Diesen Ansätzen wurde nach Abkühlung DFP (c = 2g/l Puffer) dazugegeben und der Abbau pro Stunde bei Zimmertemperatur (25° C) gemessen. Gleichzeitig lief ein Leerwert (DFP in Puffer statt in Serum) bei Zimmertemperatur mit.

Meßansatz I : 1 ml Serum + 1 ml Puffer 30 Min. bei 55° C erhitzt. Nach Abkühlung DFP (c = 2 g/l Puffer) dazugegeben.

Meßansatz II : 1 ml Serum + 1 ml Puffer 60 Min. bei 55° C erhitzt. Nach Abkühlung DFP (c = 2g/l Puffer) dazugegeben.

Meßansatz III: 2 ml Puffer + DFP (c = 2 g/l Puffer) bei 25° C (Leerwert, d.h. kein Serum, kein Erhitzen).

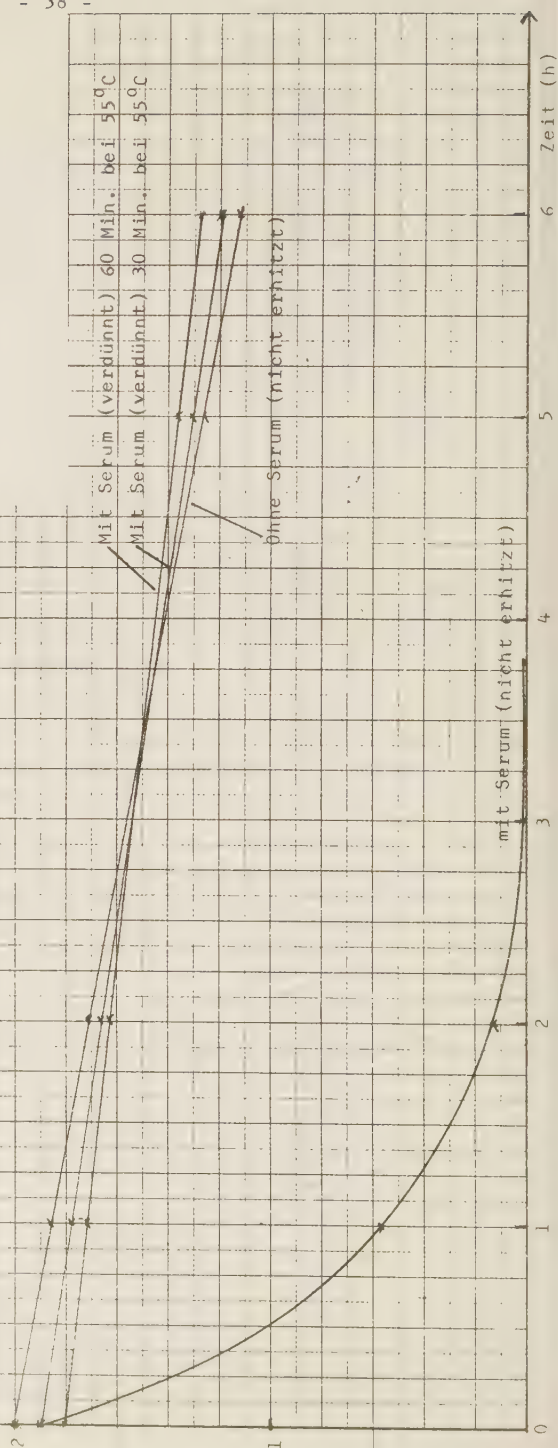
Die erhaltenen Werte dieses Versuches wurden im Diagramm S.38 und in der Tabelle 13 auf S.37 wiedergegeben. Man erkennt, daß die Kurven mit DFP im zunächst verdünnten und dann erhitzten Serum fast identisch verlaufen mit der Leerwertskurve (DFP in Puffer bei 25° C). Dabei spielt es keine Rolle, ob das verdünnte Serum 30 oder 60 Minuten lang erhitzt wurde.

Tabelle 13: Verlauf der DFP-Abnahme in bereits mit Puffer verdünntem Serum

Stu.	Meßansatz I			Meßansatz II			Meßansatz III		
	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeiteinheit	DFP-Konz. in % d. AK	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeiteinheit	DFP-Konz. in % d. AK	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeiteinheit	DFP-Konz. in % d. AK
0	1,73	7 %	87	1,85	11 %	93	2,00	14 %	100
1	1,61	8 %	81	1,64	15 %	82	1,72	15 %	86
2	1,48	6 %	74	1,39	6 %	70	1,46	3 %	73
3	1,39	9 %	70	1,31	2 %	66	1,41	13 %	71
4	1,26	12 %	63	1,29	6 %	65	1,23	14 %	62
5	1,11	9 %	56	1,21	12 %	61	1,06	10 %	53
6	1,01		51	1,07		54	0,95		48

Abbildung 7

Erhitzen des verdünnten Serums
auf 55°C, 30 bzw. 60 Min. ($c=2\text{g/l}$)



d) Aufstockungsversuche

Bei dem folgenden Versuch wurde die DFP-Abnahme in Ansätzen mit Serum und mit Puffer ca. 45 Minuten lang bis zur ungefähren Halbwertszeit verfolgt. Nach ca. 60 Min. wurde mit 2 g DFP/l aufgestockt, um zu sehen, ob eventuelle Spaltprodukte auf die weitere DFP-Abnahme hemmend oder verlangsamen wirken.

Tabelle 14: Aufstockungsversuch

c = 2 g/l (Ausgangskonzentration)						
Std.	Ansatz mit Serum			Ansatz ohne Serum		
	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeitinterv.	Konz. in % d. AK	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeitinterv.	Konz. in % d. AK
0	1,87		94	2,00		100
0,50	1,20	36 %	64	1,76	12 %	88
0,75	0,84	30 %	45			
1,00	Aufstockung mit 2g DFP/l			Aufstockung mit 2g DFP/l		
1,00	2,58	200 % +	136	3,60		180
2,00	1,43	45 %	76	3,31	8 %	166
3,00	0,55	62 %	29	3,20	4 %	160
5,00	0,06	88 %	3	2,91	9 %	145

Die erhaltenen Werte des Versuchs sind im Diagramm S.40 (Abb.8) wiedergegeben. Vergleicht man diesen Kurvenverlauf des Ansatzes mit Serum mit jenem im Diagramm S.32 (Abb.5), so erkennt man keinen signifikanten Unterschied durch die Aufstockung, so daß die Rolle der Bildung von Spaltprodukten unter unseren Versuchsbedingungen fast vernachlässigt werden darf.

Konz.
(%)

- 40 -

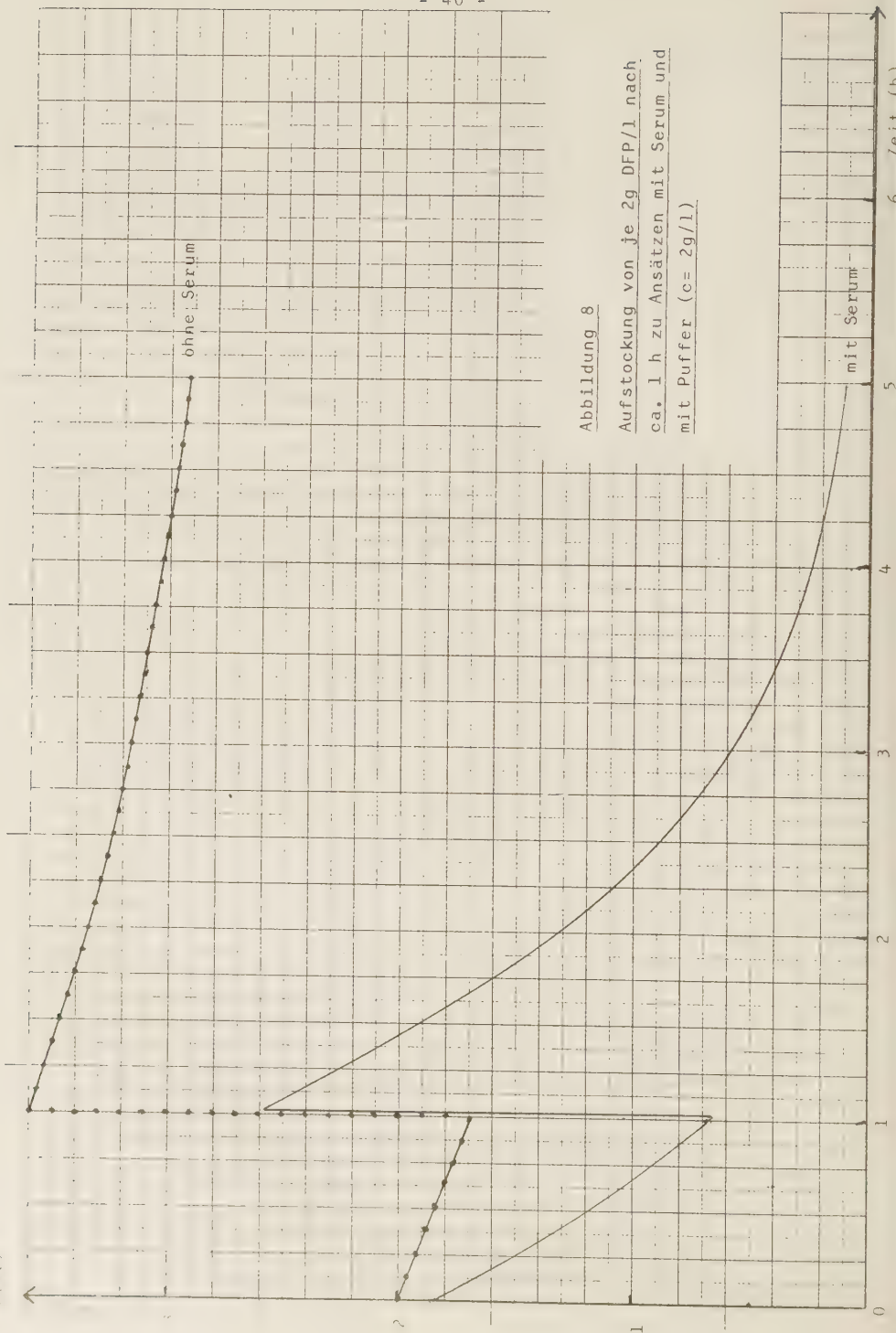


Abbildung 8

Aufstockung von je 2g DFP/1 nach
ca. 1 h zu Ansätzen mit Serum und
mit Puffer (c= 2g/l)

Zeit (h)

3. Auswertung: Diskussion des Abbauverhaltens von DFP

a) Abnahme von DFP in Phosphatpuffer

Es sollte untersucht werden, wie sich DFP in Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 25° C - ohne Zusatz von Serum - verhält.

Die folgende Tabelle 15 zeigt die Werte der DFP-Abnahme bei den Ausgangskonzentrationen von $c = 2$ und $c = 4$ g/l (vgl. die Experimente auf S.29 und S.31).

Tabelle 15

Std.	DFP in Puffer			
	c = 2 g/l		c = 4 g/l	
	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeiteinheit	DFP-Konz. (g/l)	Abfall pro Zeiteinheit
0	2,00	8 %	4,00	15 %
1	1,84	12 %	3,38	12 %
2	1,61	14 %	2,98	6 %
3	1,39	12 %	2,80	7 %
4	1,22	24 %	2,59	7 %
5	0,93	30 %	2,40	6 %
6	0,65		2,30	11 %
7			2,05	10 %
8			1,85	10 %
9			1,67	14 %
10			1,45	

Auf dem Diagramm S.42 (Abb.9) zeigt sich ein fast linearer Kurvenverlauf der DFP-Abnahme in Puffer. Unter den gewählten Bedingungen ist eine DFP-Abnahme praktisch nur durch Hydrolyse möglich, weil die Möglichkeit einer Bindung an Proteine nicht gegeben ist. Bei der nichtenzymatischen Hydrolyse von DFP in Puffer darf eine Reaktion 1.Ordnung angenommen werden, weil das Gleichgewicht der Reaktion völlig auf Seiten der Hydro-

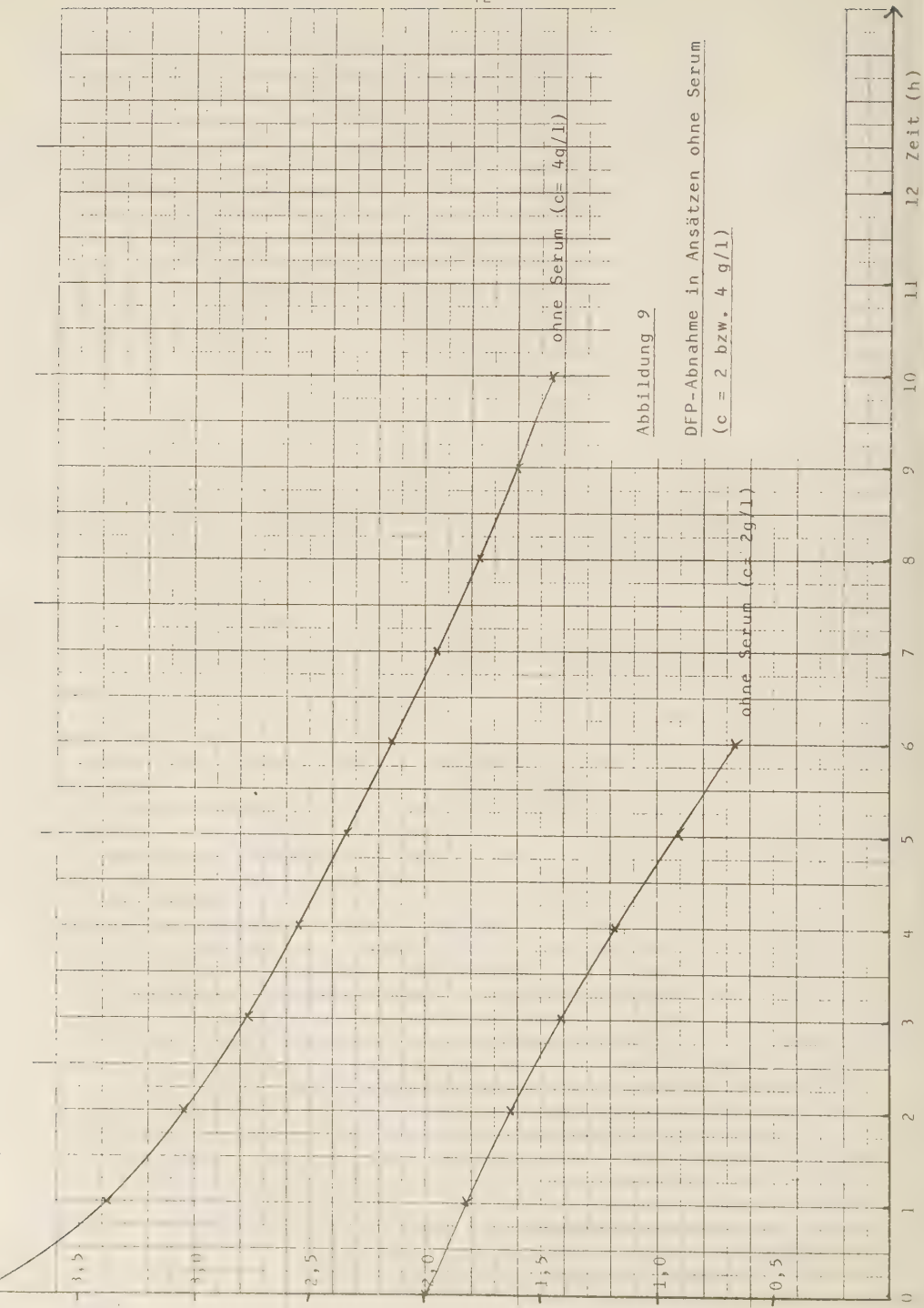


Abbildung 9

DFP-Abnahme in Ansätzen ohne Serum
(c = 2 bzw. 4 g/l)

lysate liegt. Allerdings nimmt auch hier die Halbwertszeit - wie bei DFP in Serum - mit steigender Menge von DFP im Ansatz zu, bei einer Reaktion 1. Ordnung sollte jedoch die Halbwertszeit konstant bleiben (LATSCHA und KLEIN 1975).

b) Abnahme von DFP im erhitzten und nichterhitzten Serum

(1) Abnahme von DFP im Serum bei einer Temperatur von 25° C

Aus allen Versuchen (S.23 bis S.40) ist ersichtlich, daß DFP im Serum bei einer Temperatur von 25° C nach entsprechend langer Zeit nicht mehr nachweisbar ist. Die Abnahme von DFP im Serum erfolgt wesentlich rascher als in Puffer, wie die Diagramme auf den Seiten 30 und 32 (Abb. 4 und 5) veranschaulichen. Drei Faktoren sind für die rasche Abnahme von DFP im Serum verantwortlich: erstens die Eiweißbindung, die gleich nach Zugabe von DFP zu Serum zum Tragen kommt, zweitens die enzymatische Hydrolyse und drittens - wie bei allen wäßrigen Lösungen - die spontane Hydrolyse.

(2) Abnahme von DFP in vorher erhitztem Serum

Anhand der Versuche auf den Seiten 33-38 sollte die Abnahme der DFP-Konzentration im vorher unter verschiedenen Bedingungen erhitzten Serum (30 bzw. 60 Min. bei 55° C) verfolgt werden, um die enzymatische Hydrolyse bzw. Proteinbindung auszuschalten.

In den folgenden Tabellensind die Werte der DFP-Abnahme einerseits im vorher 30 Min. (Tab. 16) bzw. 60 Min. (Tab.17) auf 55° C erhitzten Serum(sowohl im unverdünnten als auch im verdünnten Serum) und andererseits im nichterhitzten Serum bzw. im Puffer aufgezeigt.

(11) Vorherige Erhitzung des Serums 30 Min. bei 55° C

Tabelle 16

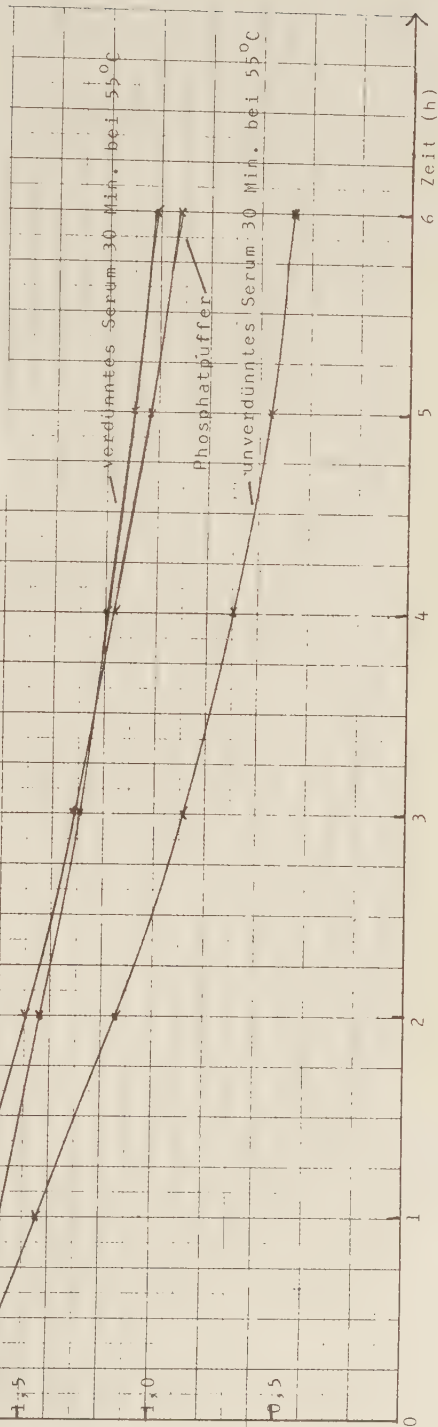
	<u>Erhitzt</u>		<u>Nicht erhitzt</u>	
	Unverdünnt	Verdünnt	Ohne Serum	Mit Serum
<u>Std.</u>	<u>DFP-Konz.</u> <u>(g/l)</u>	<u>DFP-Konz.</u> <u>(g/l)</u>	<u>DFP-Konz.</u> <u>(g/l)</u>	<u>DFP-Konz.</u> <u>(g/l)</u>
0	1,74	1,73	2,00	1,96
1	1,44	1,61	1,71	0,63
2	1,09	1,48	1,43	0,11
3	0,89	1,39	1,33	0,02
4	0,70	1,26	1,13	0,002
5	0,55	1,11	1,01	0,001
6	0,32	1,01	0,92	0,0005

Nach 6 Stunden war im vorher unverdünnt erhitzten Serum nur noch ein knappes Drittel der DFP-Menge des parallel laufenden Ansatzes mit dem vorher verdünnt erhitzten Serum zu finden, d.h. die Abnahme von DFP erfolgte im vorher unverdünnt erhitzten Serum bedeutend rascher. Die Serumproteine sind teilweise denaturiert worden und bewirkten somit eine Herabsetzung der Proteinbindungsfähigkeit sowie der enzymatischen Hydrolyse, die im unverdünnt erhitzten Serum deutlicher zum Ausdruck kommt.

Die Kurve der DFP-Abnahme im vorher verdünnt erhitzten Serum und die des Leerwerts verlaufen fast identisch, wie das Diagramm S.45 (Abb.10) zeigt. Durch die Verdünnung des Serums mit Puffer wurde der Proteinanteil im Ansatz vermindert und damit auch die Fähigkeit zur Proteinbindung und zur enzymatischen Hydrolyse reduziert.

Abbildung 10

DFP-Abnahme in erhitztem Serum
(verdünnt und unverdünnt), 30 Min.
bei 55°C
Zum Vergleich: DFP-Abnahme in
Puffer



(22) Vorherige Erhitzung des Serums 60 Min. auf 55° C

Tabelle 17

Std.	Erhitzt		Nicht erhitzt	
	Unverdünnt	Verdünnt	Ohne Serum	Mit Serum
	DFP-Konz.	DFP-Konz.	DFP-Konz.	DFP-Konz.
	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)
0	1,73	1,85	2,00	1,96
1	1,39	1,64	1,71	0,63
2	1,27	1,39	1,43	0,11
3	0,99	1,31	1,33	0,02
4	0,92	1,29	1,13	0,002
5	0,78	1,21	1,01	0,001
6	0,67	1,07	0,92	0,0005

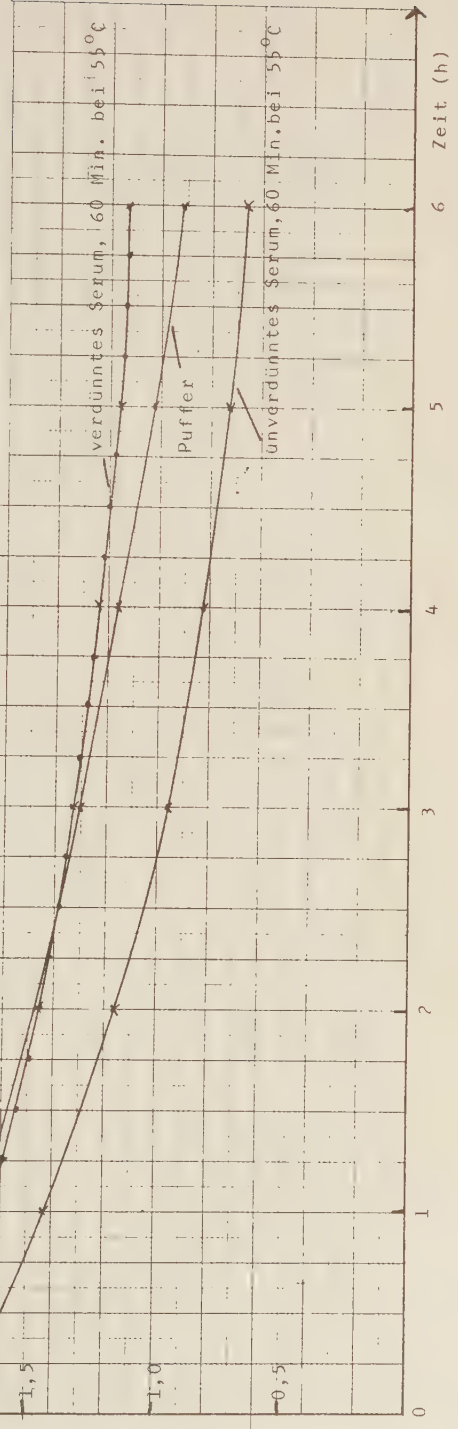
Nach 6 Stunden waren im unverdünnt erhitzten Serum noch ca. zwei Drittel der DFP-Menge des Ansatzes mit dem verdünnt erhitzten Serum zu finden, d.h. die DFP-Abnahme erfolgte im unverdünnt erhitzten Serum auch nach 60 Min. bei 55° C schneller als im verdünnten Serum, jedoch deutlich langsamer als nach 30 Min. bei 55° C. Bei dem vorhergehenden Versuch mit 30minütiger Erhitzung fand sich nur ein Drittel, d.h. nach längerem Erhitzen erfolgt die Abnahme von DFP im Serum langsamer wohl aufgrund der stärkeren Denaturierung der Eiweiße mit einer damit verbundenen teilweisen Inaktivierung der DFPase und Reduzierung der Proteinbindung.

Die Kurve des Ansatzes im Puffer (also ohne Serum) entspricht fast der Kurve mit verdünntem Serum, wie aus dem Diagramm S.47 (Abb.11) zu ersehen ist.

Abbildung 11

DFP-Abnahme in erhitztem Serum
(verdünnt und unverdünnt) 60 Min.
bei 55°C

Zum Vergleich: DFP-Abnahme in
Puffer (c 2q/l)



(33) Vergleich der Abbaugeschwindigkeit von DFP im erhitzten und nichterhitzten Serum

Vergleicht man die Kurven mit erhitztem (30 Min. bzw. 60 Min. bei 55° C) und mit nichterhitztem Serum, so ergibt sich folgende Rangliste (mit fallender Abbaugeschwindigkeit von DFP):

1. DFP in unverdünntem nichterhitzten Serum
2. DFP in unverdünntem erhitzten Serum (30 Min. bei 55°C)
3. DFP in unverdünntem erhitzten Serum (60 Min. bei 55°C)
4. DFP in verdünntem, auf 55° C erhitzten Serum (30 bzw. 60 Min.)
5. DFP in Phosphatpuffer, pH 7,4

Aus den Erhitzungsversuchen kann man schließen, daß durch Erhitzung des Serums die Enzymaktivität gemindert bzw. aufgehoben wird. Die erhaltenen Kurven verlaufen parallel zum Leerwert. Möglicherweise sind auch durch die Erhitzung des Serums Molekülstrukturen mit der Fähigkeit zur irreversiblen Bindung freigeworden. Jedenfalls ist der graphisch dargestellte Verlauf der DFP-Abnahme im Serum um einen konstanten Betrag nach unten verschoben. Dieser Effekt scheint stärker zu sein, wenn das Serum im unverdünntem Zustand erhitzt wird. Dagegen zeigt sich beim verdünnt erhitzten Serum bei der DFP-Abnahme ein noch geringerer Unterschied zum Leerwert, die Kurven verlaufen fast identisch (Abb.10 S.45 und Abb.11 S.47).

c) Gleichgewicht der Reaktion

Aus den obigen Abbauprobeversuchen von DFP im Serum ist ersichtlich, daß DFP im Serum nach entsprechend langer Zeit nicht mehr nachweisbar ist, d.h. daß das Gleichgewicht der Reaktion sehr weit auf Seiten der Spaltprodukte liegt. Deshalb braucht bei der folgenden Kurvendiskussion nur die Reaktion "DFP $\rightarrow$ Spaltprodukte" und nicht die Rückreaktion "Spaltprodukte $\rightarrow$ DFP" berücksichtigt werden.

d) Proteinbindung und enzymatischer Abbau von DFP im Serum

(1) DFP-Abnahme im Serum: eine Reaktion 1. Ordnung?

Unter der oben erwähnten Prämisse der Gleichgewichtslage ganz rechts ist im einfachsten Fall das Abbauverhalten einer Reaktion 1. Ordnung zu erhalten sowie eine bestimmte Geschwindigkeitskonstante, d.h.

$$\begin{aligned}v &= -k \cdot [\text{DFP}] = -\frac{d[\text{DFP}]}{dt} \\[\text{DFP}] &= [\text{DFP}]_0 \cdot e^{-kt} \\k &= \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{[\text{DFP}]_0}{[\text{DFP}]}\end{aligned}$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit

k = Reaktionskonstante bzw. Geschwindigkeitskonstante

$[\text{DFP}]$ = Konzentration von DFP

$[\text{DFP}]_0$ = Konzentration von DFP zu Beginn des Versuchs

t = Zeit

In der folgenden Tabelle wird überprüft, inwieweit anhand des Diagramms S.32 (Abb.5) mit $c = 4$ g/l der Konzentrationsabfall von DFP im Ansatz mit Serum tatsächlich einer Reaktion 1. Ordnung entspricht. Die Geschwindigkeitskonstante k wird abschnittsweise (pro Stunde) nach der oben angegebenen Formel berechnet. Im Idealfall müßte sie konstant bleiben.

Tabelle 18: Berechnung der Geschwindigkeitskonstante für
c = 4 g/l (Ansatz mit Serum)

c = 4 g/l		
Ansatz mit Serum		
	DFP-Konz.(g/l) nach n Stunden	k
	DFP ₀ = 3,84	0
	DFP ₁ = 2,23	0,54
	DFP ₂ = 1,44	0,49
	DFP ₃ = 0,90	0,48
	DFP ₄ = 0,61	0,46
	DFP ₅ = 0,40	0,45
	DFP ₆ = 0,25	0,46
	DFP ₇ = 0,10	0,52
	DFP ₈ = 0,02	0,66
	DFP ₉ = 0,004	0,76
	DFP ₁₀ = ./.	./.

Die Spalte k zeigt, daß k relativ konstant ist, wie es bei einer Reaktion 1. Ordnung zu erwarten ist. Auch die nicht-enzymatische Hydrolyse dürfte einer Reaktion 1. Ordnung entsprechen, wie auf S.41 unten ausgeführt. Eine Überlagerung zweier gleichzeitig verlaufender Reaktionen 1. Ordnung ergibt immer wieder eine Reaktion 1. Ordnung, da in diesen Fällen die Menge des gespaltenen Substrats pro Zeiteinheit immer proportional zur momentanen Substratkonzentration ist:

Enzymanteil	:	$v_{\text{Enz}} = -k_{\text{Enz}} \cdot [\text{DFP}]$
Nichtenzym. Anteil	:	$v_{\text{Nenz}} = -k_{\text{Nenz}} \cdot [\text{DFP}]$
Gesamtreaktion:		$v_{\text{ges}} = v_{\text{Enz}} + v_{\text{Nenz}}$

Zu Beginn des Versuchs S.50 (Tabelle 18) scheint sich der Abbau zunächst schneller (entsprechend dem höheren k) zu vollziehen. Es handelt sich jedoch hier wohl nicht um einen schnelleren enzymatischen Abbau, sondern um den Einfluß der Eiweißbindung, die unmittelbar nach Zugabe des DFP erfolgt.

- (2) Vergleich des Abbaus steigender Mengen von DFP im Serum im ersten Zeitintervall

Vergleicht man in Tabelle 20 S.52 den Abbau steigender Mengen von DFP im Serum in den ersten 10 Minuten, so wird deutlich, daß bei steigenden Ausgangsmengen von DFP im Serum pro Zeiteinheit vom vorhergehenden Wert prozentual immer weniger, aber - was die Menge an DFP anbetrifft - immer mehr abgebaut wird. Bei niedrigen Konzentrationen von DFP muß nach Zusatz von Serum sofort extrahiert werden, weil sonst DFP innerhalb von Sekunden praktisch vollständig an Eiweiß gebunden wird und somit im Chromatogramm kein Peak mehr erscheint.

Tabelle 19: Abbau steigender Mengen von DFP im Serum im ersten Zeitintervall

Min.	DFP-Konz. mq/l	Konz.- abfall	DFP-Konz. mq/l	Konz.- abfall	DFP-Konz. mq/l	Konz.- abfall
0	200	180 mq	400	323 mq	800	556 mq
10	20	= 90 %	77	= 81 %	244	= 69 %

Tabelle 20: Vergleich des Abbaus steigender Ausgangskonzentrationen von DFP (mit Serum) und der prozentualen Abbauraten pro Zeitintervall

Konz. Zeit	100 mg/l	Konz.- abfall	200 mg/l	Konz.- abfall	400 mg/l	Konz.- abfall	800 mg/l	Konz.- abfall	1000 mg/l	Konz.- abfall	2000 mg/l	Konz.- abfall	4000 mg/l	Konz.- abfall
0 Min.	100	90%	200		400		800	69%	1000	50%	1940		3840	
10 Min.	10,5	100%	19,7		77,1		244,4	72%	485	64%				
20 Min.	./.		1,5	100%	8,5		69,6	77%	166	47%				
30 Min.			./.		0,8		16,3	80%	88	75%	1020	75%		42%
40 Min.					./.		3,2	87%	22	82%				
50 Min.							0,4	100%	4	90%				
1 Std.							./.		0,4	100%	490	82%	2230	35%
2 Std.									./.		90	66%	1440	37%
3 Std.											30	73%	900	32%
4 Std.											8	75%	610	34%
5 Std.											2	50%	400	37%
6 Std.											1	100%	250	60%
7 Std.											./.		100	80%
8 Std.													20	80%
9 Std.													4	100%
10 Std.													./.	

Der obige Vergleich des Mengenabfalls von DFP im Serum läßt vermuten, daß am Abbau Enzyme beteiligt sind, die bei größeren DFP-Mengen in relativ geringerem Maße zur Verfügung stehen.

(3) Vergleich der Kurvenverläufe der DFP-Abnahme im Serum bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen

Zur Verdeutlichung des unterschiedlichen Verlaufs der Kurven für die Abnahme von DFP im Serum ($c = 0,8 - 4 \text{ g/l}$) wurden in dem Diagramm S.34 (Abb.12) die Kurven von $c = 0,8 - 2 \text{ g/l}$ soweit nach rechts verschoben, daß deren Anfang von der Kurve $c = 4 \text{ g/l}$ ausgeht. Dabei zeigt sich bei den niedrigeren Konzentrationen ein erheblich steilerer Kurvenabfall als bei der Kurve $c = 4 \text{ g/l}$ im gleichen Zeitintervall. Der flachere Abfall der Kurve $c = 4 \text{ g/l}$ läßt sich unter Umständen damit erklären, daß sich hier im Unterschied zu den anderen Konzentrationen ($c = 0,8 - 2 \text{ g/l}$) Spaltprodukte angehäuft haben könnten. Prinzipiell ist hier eine zunehmende Rückreaktion der Spaltprodukte in Betracht zu ziehen. Wie oben erläutert, fällt diese jedoch kaum ins Gewicht. Es könnte sich jedoch auch um eine Hemmung der Enzyme durch Spaltprodukte handeln.

e) Vergleich der Halbwertszeiten von DFP im Serum bei verschiedenen Konzentrationen

Die Halbwertszeit beim DFP-Abbau im Serum zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration: Je höher die Ausgangsmenge von DFP im Serum, desto länger die Halbwertszeit. Dieser Effekt könnte zurückzuführen sein auf den Einfluß einer Enzymhemmung durch Spaltprodukte und einer Eiweißbindung auf der Grundlage einer Reaktion 1. Ordnung.

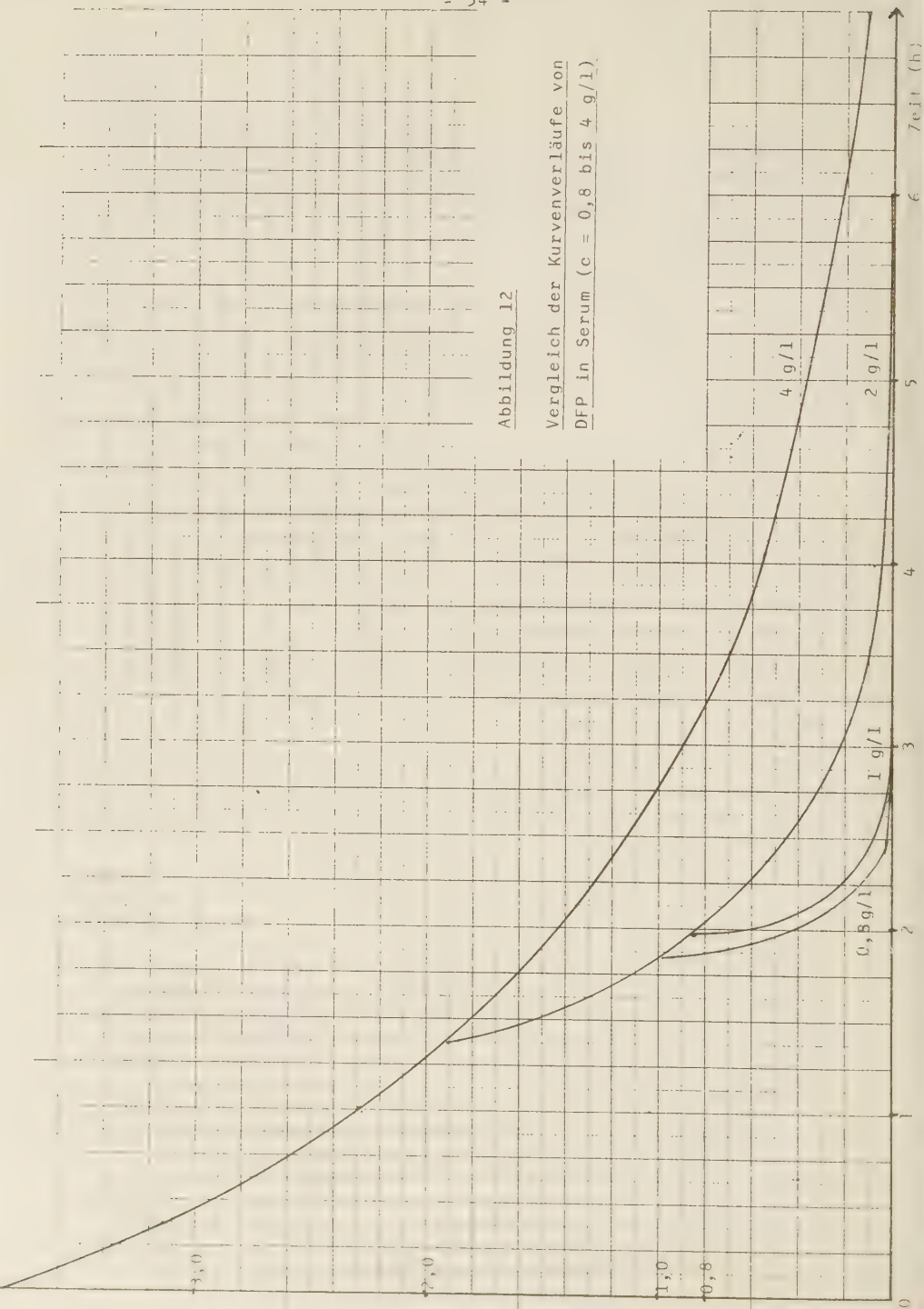


Abbildung 12

Vergleich der Kurvenverläufe von
DFP in Serum ($c = 0,8$ bis 4 g/l)

Tabelle 21: Halbwertszeiten in Abhängigkeit von der Konzentration von DFP im Serum

<u>DFP-Konz.</u>	<u>HWZ</u> <u>DFP in Serum</u>	<u>HWZ</u> <u>DFP in Puffer</u>
32 mg/l = $1,7 \cdot 10^{-4}$ Mol/l	2 Min.	
100 mg/l = $5,4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l	3 Min.	
200 mg/l = $1,1 \cdot 10^{-3}$ Mol/l	4 Min.	
400 mg/l = $2,2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l	5 Min.	
800 mg/l = $4,4 \cdot 10^{-3}$ Mol/l	8 Min.	
1000 mg/l = $5,4 \cdot 10^{-3}$ Mol/l	11 Min.	
2000 mg/l = $1,1 \cdot 10^{-2}$ Mol/l	30 Min.	276 Min.
4000 mg/l = $2,2 \cdot 10^{-2}$ Mol/l	85 Min.	435 Min.

Die Halbwertszeiten wurden den Kurven des Diagramms auf S.54 (Abb.12) entnommen. Das Diagramm S.56 (Abb.13) zeigt, daß die Beziehung zwischen Halbwertszeit und Konzentration nicht linear ist.

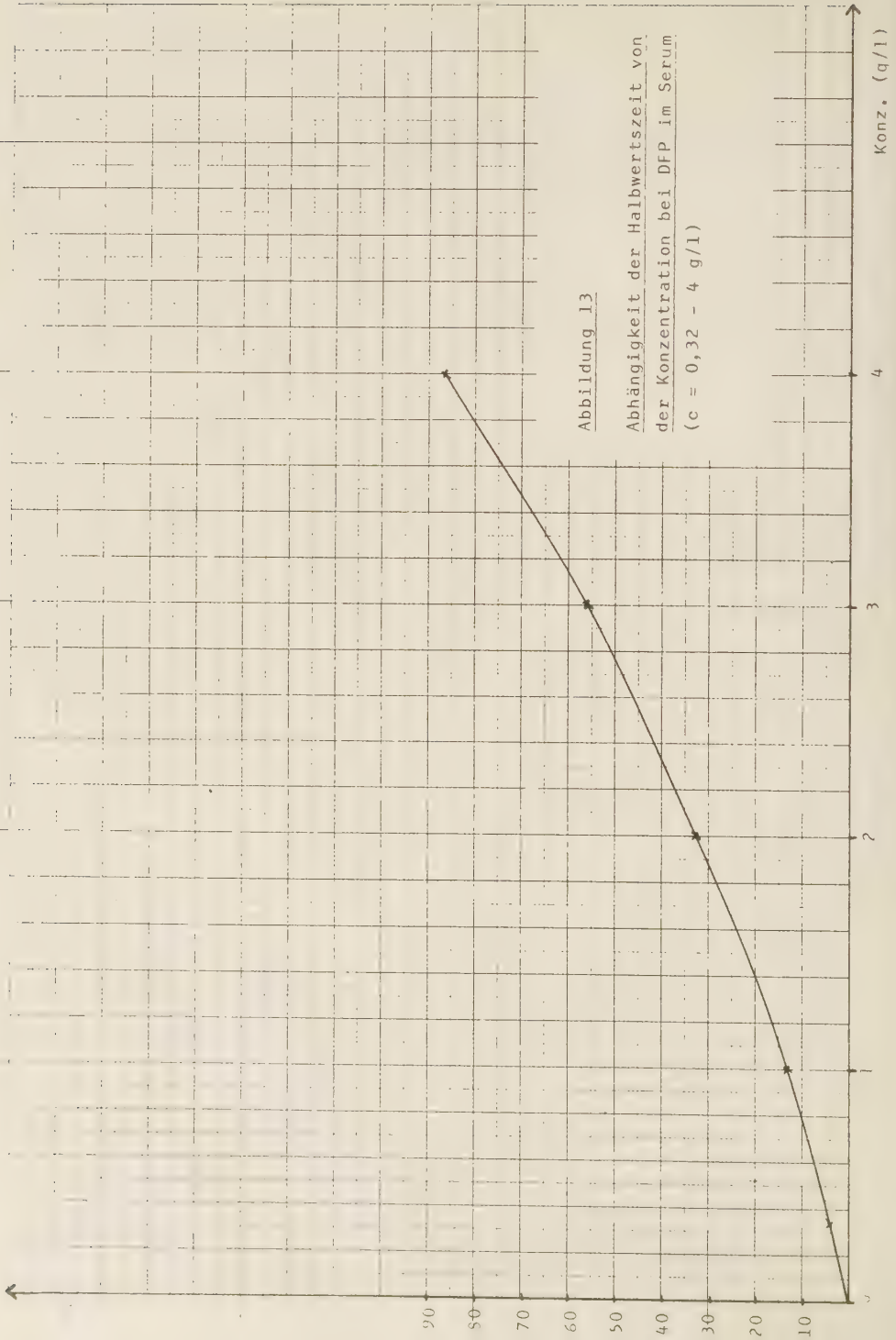
f) Gegenüberstellung der DFP-Abnahme in Serum bzw. in Puffer

- (1) Vergleich des Kurvenverlaufs der DFP-Abnahme bei Einsatz steigender Mengen von DFP in Ansätzen mit Serum und mit Puffer bei sofortiger Extraktion

Im Diagramm S.24 zeigt die obere Kurve die Mengen von DFP in reinem Puffer (ohne Serum), die untere Kurve die Konzentrationen von DFP im Serum. In beiden Fällen wurde jeweils sofort nach Ansatz der Mischung mit Benzol extra-

Abbildung 13

Abhängigkeit der Halbwertszeit von
der Konzentration bei DFP im Serum
($c = 0,32 - 4 \text{ g/l}$)



hiert. Die Konzentrationen wurden im Diagramm anhand der Area-Beträge verglichen. Die untere Kurve verläuft ebenso wie die obere geradlinig, d.h. daß in dem angegebenen Konzentrationsbereich von 0,75 - 2 mg/l ein gleichbleibender Prozentsatz von DFP im Chromatogramm nicht mehr ausgewiesen wird. Da unmittelbar nach Mischung des Ansatzes extrahiert wird, kann man den relativ langsamen enzymatischen Abbau vernachlässigen. Vielmehr ist hier eine Bindung des DFP an Eiweißbestandteile zu diskutieren.

- (2) Vergleich des Verlaufs der DFP-Abnahme in Ansätzen mit Serum und mit Puffer bei gleicher Ausgangskonzentration

Um den Kurvenverlauf von DFP im Serum einerseits und in Puffer andererseits vergleichen zu können, wurde die gleiche Ausgangsmenge von DFP im ersten Ansatz in Serum, im zweiten Ansatz in Puffer gegeben und der zeitliche Verlauf des Abbaus von DFP festgehalten (Tabelle 22 S.58).

Beim Vergleich des Abfalls von DFP in Serum bzw. in Puffer erkennt man anhand des Diagramms S.32 (Abb.5), daß die Kurve für DFP in Serum exponentiell verläuft und die Kurve für DFP in Puffer - entsprechend der längeren Halbwertszeit von DFP in Puffer - annähernd linear. Der prozentuale DFP-Abfall pro Zeiteinheit bleibt bei dem DFP-Abbau in Puffer sowie in Serum ziemlich konstant, wie es bei einer Reaktion 1. Ordnung zu erwarten ist. Auch erfolgt die DFP-Abnahme im Ansatz mit Serum bedeutend rascher als im Ansatz ohne Serum, wie schon auf S.43 diskutiert.

Tabelle 22: Vergleich der DFP-Abnahme in Ansätzen mit Serum
und mit Puffer bei gleicher Ausgangskonzentration

<u>Std.</u>	<u>Ansatz mit Serum</u>		<u>Ansatz ohne Serum</u>	
	<u>DFP-Konz.</u> g/l	<u>Abfall pro</u> <u>Zeiteinheit</u>	<u>DFP-Konz.</u> g/l	<u>Abfall pro</u> <u>Zeiteinheit</u>
0	3,84		4,00	
		42 %		15 %
1	2,23		3,38	
		35 %		12 %
2	1,44		2,98	
		37 %		6 %
3	0,90		2,80	
		32 %		7 %
4	0,61		2,59	
		34 %		7 %
5	0,40		2,40	
		37 %		6 %
6	0,25		2,30	
		60 %		11 %
7	0,10		2,05	
		80 %		10 %
8	0,02		1,85	
		80 %		14 %
9	0,004		1,67	
				14 %
10	./.		1,45	

4. Zusammenfassung

Aus allen Abbauprobungen ist ersichtlich, daß DFP auch in sehr hohen Konzentrationen im Serum nach einer entsprechend langen Zeit nicht mehr nachweisbar ist, d.h. das Gleichgewicht weit auf Seiten der Spaltprodukte liegt. Dementsprechend wäre eine Reaktion 1. Ordnung anzunehmen, wofür auch die relativ konstante prozentuale Abbaurate pro Zeiteinheit spricht.

Die erhöhte Geschwindigkeitskonstante zu Beginn des Versuchs der DFP-Abnahme im Serum weist nicht auf einen schnelleren enzymatischen Abbau, sondern auf die Eiweißbindung hin, die unmittelbar nach Zugabe von DFP erfolgt.

Mit steigenden Ausgangsmengen von DFP im Serum verläuft die Abbaukurve immer flacher, so daß es sich hier zunehmend um eine Hemmung der Enzyme durch Spaltprodukte handeln könnte. Außerdem wird bei steigenden Ausgangsmengen von DFP im Serum pro Zeiteinheit prozentual immer weniger, aber - was die Menge an DFP anbetrifft - immer mehr abgebaut. Es könnten beim Abbau Enzyme beteiligt sein, die bei größeren DFP-Mengen in relativ geringerem Maß zur Verfügung stehen.

Die DFP-Abnahme im Serum erfolgt wesentlich rascher als in wäßriger Lösung, was auf die sofortige Eiweißbindung und die enzymatische Hydrolyse zurückzuführen ist.

Durch vorheriges Erhitzen des Serums wird die Abbaugeschwindigkeit von DFP herabgesetzt, bei zusätzlicher Verdünnung des Serums vor dem Erhitzen entspricht sie fast jener des Ansatzes von DFP in Puffer. Es ist offensichtlich, daß durch Erhitzen des Serums die Enzymaktivität gemindert bzw. aufgehoben wird und die Proteine so denaturiert werden, daß auch die Eiweißbindung nicht mehr wesentlich ist.

Die Halbwertszeiten beim Abbau von DFP in Serum und auch im Puffer zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration: je höher die Ausgangsmenge an DFP im Serum, desto länger die Halbwertszeit. Dieser Effekt könnte zurückzuführen sein auf den Einfluß einer Enzymhemmung durch Spaltprodukte und einer Eiweißbindung auf der Grundlage einer Reaktion 1. Ordnung.

LITERATURVERZEICHNIS

- BERENDS, R., POSTHUMUS, C.H., SLUYS, J.v.d. and DEYERKAUF, F.A.:
The chemical basis of the "ageing process" of DFP-inhibited pseudocholinesterase
Biochem. Biophys. Acta 34:576 (1959)
- BERNADON, J. et DANG QUOC QUAN, D.:
Reactivation par les alpha- hydroxyiminocétone aliphatiques des cholinestérases plasmatiques du Rat Wistar inhibées par le diisopropylfluorophosphate
C.R. Acad. Sci (D) 278:3391 (1974)
- COHEN, J.A. and WARRINGA, M.G.P.J.:
The Fate of P³² Labelled Diisopropylfluorophosphate in the Human Body and its Use as a Labeling Agent in the Study of Turnover of Blood Plasma and Red Cells.
J. Clin. Invest. 32:459 (1954)
- COHEN, J.A. and WARRINGA, M.G.P.J.:
Purification and Properties of Dialkylfluorophosphatase.
Biochem. Biophys. Acta 26:29 (1957)
- COMROE, J.H., TODD, J. and KOELLE, G.B.:
The Pharmacology of Di-isopropylfluorophosphate (DFP) in Man
J. Pharmacol. Exper. Therap. 87:281 (1946)
- DETTBARN, W.-D. and HOSKIN, C.G.:
Toxicity of DFP and Related Compounds to Squids in Relation to Cholinesterase Inhibition and Detoxifying Enzym Levels.
Bull. Environ Contam. Toxicol 13:133 (1975)
- DIXON and NEEDHAM, D.M.:
Biochemical research on chemical warfare agents
Nature 158:432 (1946)
- ELL, W.: Diisopropylfluorophosphat und die DFP-ase (E.C.3.8.2.1.), Dissertation Erlangen (1979)
- FLEISHER, J.H., HANSA, J., KILLOS, P.J. and HARRISON, C.S.:
Effects of 1,1-Trimethylene-Bis(4-Formyl-Pyridinium Bromide)Dioxime (TMB-4) on Cholinesterase Activity and Neuromuscular Block Following Poisoning with Sarin and DFP
J. Pharmac. Exp. Ther. 130:461 (1960)

- FORTH, W., HENSCHLER, D. und RUMMEL, W.:
Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und
Toxikologie: Seite 93 ff.
Bibliograph. Institut, Mannheim (1975)
- FREEDMAN, A.M., WILLIS, A. and HIMWICH, H.E.:
Correlation between Signs of Toxicity and
Cholinesterase Level of Brain and Blood
During Recovery from Diisopropylfluorophos-
phate (DFP) Poisoning
Am. J. Physiol. 157:80 (1949)
- GELLMAN, M.A.:
The Use of Miotics for the Correction of
Hypermetropia and Accomodative Esotropia
Amer. J. Optom. 40:93 (1963)
- GELLMAN, M.A.:
The Use of Drugs in the Diagnosis and Treat-
ment of Strabismus
Amer. J. Optom. 41:574 (1964)
- GREENBERG, H. and NACHMANSON, D.:
Isolation of Serine Phosphate from the Active
Site of Human Prostatic Acid Phosphatase;
Inhibition of the Enzyme by DFP
Biochem. Biophys. Res Commun 7:186 (1962)
- GROB, D., HARVEY, A.M., LANGWORTHY, O.R. and
LILIENTHAL, J.L. jr.:
The Administration of Diisopropylfluorophos-
phate (DFP) to Man III Effect on the Central
Nervous System with Special Reference to the
Electrical Activity of the Brain. Bull.
Johns Hopkins Hosp. 81:257 (1947)
- HANSEN, D., SCHAUM, E., und WASSERMANN, O.:
Organverteilung und Stoffwechsel von Diiso-
propylfluorophosphat (DFP) beim Meerschweinchen
Arch. Toxikol. 23:73 (1968)
- HARRISON, R.:
Bilateral Lens Opacities Associated with Use
of Di-isopropyl-Fluorophosphate Eyedrops.
Amer. J. Ophthal 50:153 (1960)
- HARVEY, A.M., LILIENTHAL, J.L. jr., GROB, J., JONES, B.F. and
TALBOT, S.A.:
The Administration of Di-Isopropylfluorophosphate
to Man.
IV The Effects on Neuromuscular Function in
Normal Subjects and in Myasthenia gravis
Bull. Johns Hopkins Hosp. 81:267 (1947)

- HOKIN, L.E. and YODA, A.:
Inhibition by Diisopropylfluorophosphate of a
Kidney Transport Adenosine Triphosphatase by
Phosphorylation of a Serinresidue.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52:454 (1964)
- HORTON, R.G., KOELLE, G.B., MC NAMARA, B.P. and PRATT, H.J.:
The Acute Toxicity of Di-isopropyl-Fluorophosphate
J. Pharmac. Exp. Ther. 87:414 (1946)
- HOSKIN, F.C.G.:
Diisopropylphosphorofluoridate and Tabun:
Enzymatic Hydrolysis and Nerve Function
Science 174:1243 (1971)
- JANDORF, B.J. and MC NAMARA, P.D.:
Fed. Proc. 8:210 (1949)
zit. n. Jandorf, B.J. and Mc Namara, P.D.
J. pharmac. & Exper. Therap. 98:77 (1950)
- JANDORF, B.J. and MC NAMARA, P.D.:
Distribution of Radiophosphorous in Rabbit
Tissues after Injection of Phosphorus-
labelled Diisopropylfluorophosphat.
J. Pharmacol. & Exper. Therap. 98:77 (1950)
- JANSZ, H.S., BRONS, D. and WARRINGA, M.G.P.J.:
Chemical nature of the DFP-bindung site of
pseudocholinesterase
Biochem. Biophys. Acta 34:573 (1959)
- JOHNSON, M.K. and BARNES, J.M.:
Age and the Sensibility of Chicks to the
Delayed Neurotoxic Effects on some Organo-
phosphorus Compounds
Biochem. Pharmac. 19:3045 (1970)
- KEWITZ, H.:
A Specific Antidote against Lethal Alkyl-
Phosphate Intoxication. III Repair of Chemical
Lesion
Arch. Biochem. and Biophys. 66:236 (1957)
- KEWITZ, H. and NACHMANSOHN, D.:
A Specific Antidote against Lethal Alkyl-
Phosphate Intoxication. IV Effects in Brain
Arch. Biochem. and Biophys. 66:721 (1957)

- KOELLE, G.B. and GILMAN, A.:
The Relationship between Cholinesterase
Inhibition and the Pharmacological Action
of Di-isopropyl-Fluorophosphate (DFP).
J. Pharmacol. & Exper. Therap. 87:421 (1946a)
- KOELLE, G.B. and GILMAN, A.:
The Chronic Toxicity of Di-isopropyl-Fluoro-
phosphate (DFP) in Dogs, Monkeys and Rats.
J. Pharmacol. & Exper. Therap. 87:435 (1946b)
- LATKI, O. and ERDMANN, W.D.:
Hemmung und Reaktivierung von Cholinesterasen
nach der Vergiftung mit Paraoxon und DFP in
vitro.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path.
Pharm. 240:514 (1961)
- LATSCHA, H.P. und KLEIN, H.A.:
Chemie für Mediziner, 2. Auflage (1975),
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
1975
- LEOPOLD, J.H. and COMROE, J.H. jr.:
Use of Diisopropyl-Fluorophosphate ("DFP")
in Treatment of Glaucoma.
Arch. Ophth. 36:1 (1946a)
- LEOPOLD, J.H. and COMROE, J.H. jr.:
Effect of Diisopropyl-Fluorophosphate
("DFP") in the Normal Eye.
Archiv Ophth. 36:17 (1946b)
- MACKWORTH, J.P.:
unveröffentlichte Arbeit (1942)
zit. n. Modell, W. et al.
J. Pharmacol. & Exper. Therap. 87:400 (1946)
- MC COMBIE, H. and SOUNDERS, B.C.:
Alkylfluorophosphonates, preparation and
physiological properties.
Nature 157:287 (1946)
- MOON, A.Y., MERCONROFF, J. and HESS, G.P.:
Characterization of a Reversibly Formed
Enzym Complex in the Reaction of Chymotrypsin
with Diisopropyl-Fluorophosphate
J. Biol. Chem. 240:717 (1965)

- MOUNTER, L.A.:
Metabolism of Organophosphorus Anticholinesterase Agents
in: Handbuch der Experimentellen Pharmakologie,
hrsg. von Koelle, G.B., Band 15:486, Springer-
Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1963)
- MOUNTER, L.A., FLOYD, C.S. and CHANUTIN, A.:
Dialkylfluorophosphatase of Kidney
I. Purification and Properties
J. Biol. Chem. 204:221 (1953)
- MOUNTER, L.A. and CHANUTIN, A.:
Dialkylfluorophosphatase of Kidney
III. Studies of Activation and Inhibition
by Cofactors
J. Biol. Chem. 210:219 (1954a)
- MOUNTER, L.A. and DIEN, L.T.H.:
Liberation of Hydrofluoric Acid by Enzymatic
Hydrolysis of Dialkylfluorophosphates
Proc. Soc. Exp. Biol. 87:40 (1954b)
- MOUNTER, L.A., DIEN, L.T.H. and CHANUTIN, A.:
The Distribution of Dialkylfluorophosphatases
in the Tissues of Various Species
J. Biol. Chem. 215:691 (1955)
- MOUNTER, L.A., ALEXANDER, H.C., TUCK, K.D. and DIEN, L.T.H.:
The pH Dependence and Dissociation Constants of
Esterases and Proteases Treated with Diisopropyl-
Fluorophosphate
J. Biol. Chem. 226:867 (1957)
- MUNKNER, T., MATZKE, J. and VIDEBAEK, A.:
Cholinesterase Activity of Human Plasma after
Intramuscular Diisopropyl-Fluorophosphate (DFP)
Acta pharmacol. et toxicol. 18:170 (1961)
- MURACHI, T.:
A general reaction of diisopropylphosphoro-
fluoridate with proteins without direct effect
on enzymic activities
Biochem. Biophys. Acta 71:239 (1963)
- NACHMANSON, D., ROTHENBERG, M.A. and FELD, E.A.:
The in vitro Reversibility of Cholinesterase
Inhibition by Diisopropyl-Fluorophosphate (DFP)
Arch. Biochem. 14:197 (1947)

- NACHMANSOHN, D., ROTHENBERG, M.A. and FELD, E.A.:
Studies on Cholinesterase
V. Kinetics of the Enzym Inhibition
J. Biol. Chem. 174:247 (1948)
- NAESS, K.: The Specificity of Diisopropylfluorophosphate (DFP)
Acta pharmacol. et toxicol. 12:154 (1956)
- OHNESORGE, F.K. und von KREUDENSTEIN, H.S.:
Hemmung der Cholinesterase-Aktivitäten von Erythrozyten, Ventrikelmuskulatur und Gehirn von Meerschweinchen durch subchronische und akute Vergiftung mit Diisopropylphosphorfluoridat (DFP) und ihre Reaktivierbarkeit durch Obidoxim
Arch. Toxicol. 26:102 (1970)
- OOSTERBAAN, R.A., KUNST, P., von ROTTERDAM, J. and COHEN, J.A.:
The Reaction of Chymotrypsin and Diisopropylphosphorofluoridate
II The Structure of Two DP-Substituted Peptides from Chymotrypsin-DP
Biochem. Biophys. Acta 27:556 (1958)
- QUILLIAM, J.P.:
Di-Iso-Propylfluorophosphonate (DFP)
Its Pharmacology and its Therapeutic Uses in Glaucoma and Myasthenia Gravis
Post-Grad. M.J. 23:280 (1947)
- RAMACHANDRAN, B.V.:
The Influence of DFP, Atropine and Pyridinium Aldoximes on the Rate of Clearance of Diisopropyl Phosphate $DI^{32}P$ from the Mouse Circulatory System
Biochem. Pharmac. 16:2061 (1967)
- RAMACHANDRAN, B.V.:
Catalytic Effect of Phosphate & Oximes on Non-Enzymic Hydrolysis of Diisopropyl Phosphorofluoridate.
Indian J. Biochem. Biophys. 8:112 (1971)
- RUMP, S., GALECKA, E., GRUDZINSKA, A., JIOZUK, I., RABSZTYN, T.:
New Trends in Experimental Therapy of Organophosphate Intoxications
Inviron. Qualif. Saf. 3:609 (1975)
- SCHLAACK, M.:
Schwere Vergiftung mit Diisopropylfluorophosphat
Arch. Toxicol. 22:155 (1966)

- SILVER, S.D.: The Toxicity of Dimethyl-, Diethyl-, and Diisopropyl-Fluorophosphate Vapors.
J. Indust. Hyg. & Toxicol. 30:307 (1948)
- TANABE, A., HORI, S. and TORIUNI, T.:
Studies on the Cholinesterase of the Chicken I Pseudocholinesterase of the Plasma and Diisopropylfluorophosphate - Resistant Pseudocholinesterase of the Liver and Other Tissues.
Jap. J. vet. Sci. 33:69 (1971)
- VERBEKE, R.: Nouvelles Contributions à la Pharmacologie du Di-isopropylfluorophosphate (DFP)
Arch. int. Pharmacodyn 79:1 (1949)
- WÄHLBY, S.: The Primary-Structure at the DFP-Reacting Site of a Proteolytic Enzyme from a Strain of Arthrobacter
Biochem. Biophys. Acta 151:409 (1968)
- WÄHLBY, S., ENGSTRÖM, L., BJARE, U. and VON HOFSTEIN, B.: Reaction of an Extracellular Proteolytic Enzyme from a Strain of Arthrobacter with Diisopropylphosphofluoridate (DFP)
Acta Chem. Scand. 20:1933 (1966)
- WÄHLBY, S. and ENGSTRÖM, L.:
Studies on Streptomyces Griseus Protease II The Amino Sequence around the Reactive Serin Residue of DFP-Sensitive Components with Esterase Activity.
Biochem. Biophys. Acta 151:402 (1968)
- WOOTON, J.F. and HESS, G.P.:
Evidence for the Involvement of a Tryptophan Residue in the Reaction of Diisopropylfluoridate with alpha-Chymotrypsin
Nature 188:726 (1960)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling für die Möglichkeit, in seinem Institut zu arbeiten, und Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher-von Mallinckrodt für die Überlassung des Themas und für ihre stete Bereitschaft, mich bei dessen Bearbeitung zu unterstützen. Ferner bedanke ich mich bei Herrn Dr. Schütz, der mir bei der Durchführung der gaschromatographischen Arbeiten eine große Hilfe war.

Lebenslauf

Name	Eva Pelikan
Geburtsdatum und -ort	6. Juli 1944
Familienstand	geschieden
Eltern	Georg Pelikan, pens. Ingenieur und Barbara Pelikan, Hausfrau
Geschwister	vier
Volksschule	1950-55 Feucht/Nürnberg
Oberschule	1955-61 Johannes Scharrer-Gymnasium Nürnberg, Abschluß mit Ober- sekundareife

Berufliche Tätigkeiten:

1961-63 Bankangestellte bei der Karl Schmidt-Bank Nürnberg
1963-64 Angestellte bei der Aetna-Versicherung in Buffalo/
New York, USA
1965-68 Sekretärin an der Wirtschafts- und Sozialwissen-
schaftlichen Fakultät Nürnberg

Weitere Ausbildung:

1968-70 Dolmetscher Institut Erlangen: Abschluß als staat-
lich geprüfter Übersetzer und Dolmetscher in
Englisch
1969-72 Gleichzeitig Sekretärin bei den Studentenreisen
Erlangen

Hochschulreife und Studium:

1972-75 Nürnberg-Kolleg: Erlangung der Hochschulreife 1975
1975 Sommersemester in Anglistik und Romanistik
1975-82 Medizinstudium mit Approbation 1982

Beruf:

Seit Juli 1982 Assistenzärztin am Kreiskrankenhaus in Rehau,
Innere Abteilung

Introduction

The purpose of this study is to investigate the effects of the proposed changes on the system. The study is divided into two main parts: a theoretical analysis and an empirical study. The theoretical analysis is based on the principles of the system and the proposed changes. The empirical study is based on the results of the experiments conducted on the system.

The results of the theoretical analysis show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system.

The results of the theoretical analysis show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system.

The results of the theoretical analysis show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system.

The results of the theoretical analysis show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system.

The results of the theoretical analysis show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system.

The results of the theoretical analysis show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system. The results of the empirical study show that the proposed changes have a significant effect on the system.

